

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11127864 A**

(43) Date of publication of application: **18 . 05 . 99**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09**  
**A61K 31/70**

(21) Application number: **09314463**

(22) Date of filing: **29 . 10 . 97**

(71) Applicant: **AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL**

(72) Inventor: **NISHIKAWA SATOSHI**  
**PENMECCHA KUMAR**  
**YAMAMOTO TOSHIKA**  
**TAHIRA KAZUMASA**

(54) **RNA HAVING HIGH AFFINITY FOR TAT PROTEIN OF HIV**

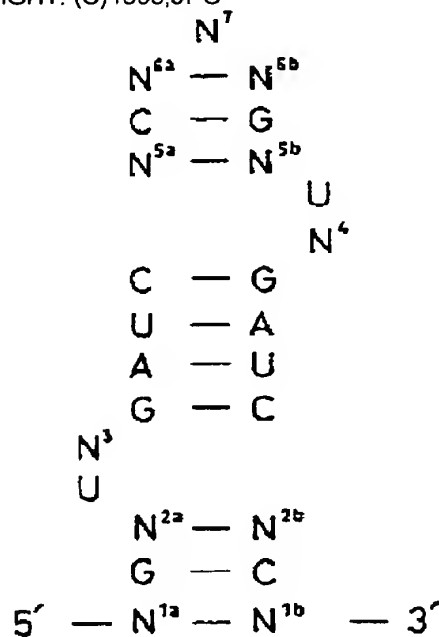
5-10 times.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a RNA capable of specifically binding to the trans activation factor protein Tat of HIV-1 in high affinity and useful for inhibiting the transcription of the HIV-1.

SOLUTION: This RNA is a ribonucleic acid containing a nucleotide sequence expressed by a secondary structure of the formula (N<sup>1a</sup> and N<sup>1b</sup> are each plural pair nucleic acid bases capable of forming complementary base pairs; N<sup>2a</sup> and N<sup>2b</sup>, N<sup>5a</sup> and N<sup>5b</sup>, and further N<sup>6a</sup> and N<sup>6b</sup> are each one or more pairs of nucleic acid bases capable of forming one or more complementary base pairs; N<sup>3</sup>, N<sup>4</sup> are each independently one or two nucleic acid bases; N<sup>7</sup> is one to five nucleic acid bases; the solid lines are each a hydrogen bond between nucleic acid bases) (double strands, when N<sup>7</sup> does not exist). The RNA is obtained by mixing Tat protein with a RNA pool of 120 nucleotides nipped with two primers, filtering the mixture to recover the complex of the Tar protein with the RNA, eluting the RNA, synthesizing cDNA by a reverse transcription reaction, proliferating the cDNA by a PCR method, and repeating an operation for preparing the RNA by a transcription reaction in vitro



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-127864

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月18日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 31/70

識別記号

Z N A

A D Y

F I

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 31/70

Z N A A

A D Y

審査請求 有 請求項の数13 F D 外国語出願 (全 80 頁)

(21) 出願番号 特願平9-314463

(22) 出願日 平成9年(1997)10月29日

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 西川 諭

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術

院 生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 ペンメッチャ クマール

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術

院 生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 山本 利香

茨城県つくば市花畑1-9-40 花畑ハイ

ツ103

(74) 指定代理人 工業技術院生命工学工業技術研究所長

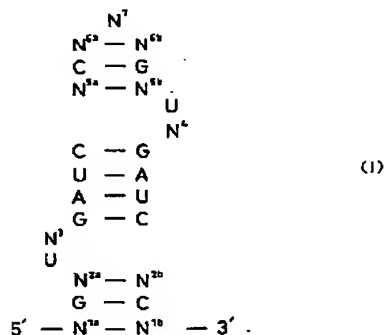
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H I V の T a t タンパク質に高い親和性を持つ R N A

(57) 【要約】

【課題】 HIVのTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAを提供する。

【解決手段】 ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化タンパク質と結合することができ、かつ下記の二次構造(I)によって表されるヌクレオチド配列を含むリボ核酸。



(構造中、N<sup>3</sup>およびN<sup>7</sup>は少なくとも2対の核酸塩基であり、N<sup>4</sup>およびN<sup>6</sup>は少なくとも1対の核酸塩基であり、N<sup>8</sup>およびN<sup>9</sup>はそれぞれ独立に1または2個の核酸塩

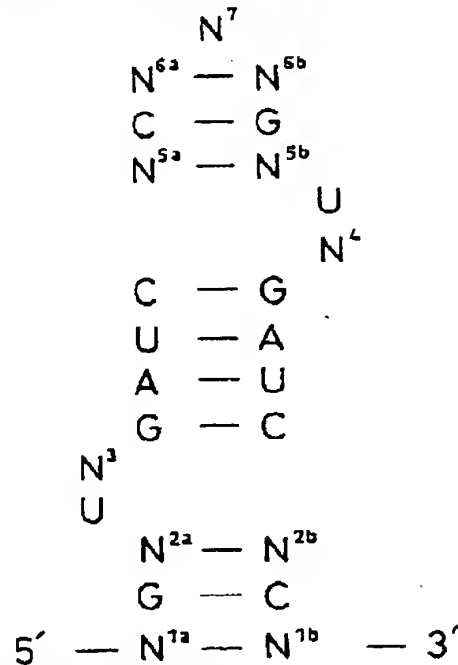
基であり、N<sup>3</sup>およびN<sup>7</sup>は少なくとも1対の核酸塩基であり、N<sup>4</sup>およびN<sup>6</sup>は少なくとも1対の核酸塩基であり、N<sup>8</sup>は0~5個の核酸塩基であり、そして実線は核酸塩基間の水素結合を表す。) 前記リボ核酸の使用。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化タンパク質と結合することができ、かつ下記の二次構造 \*

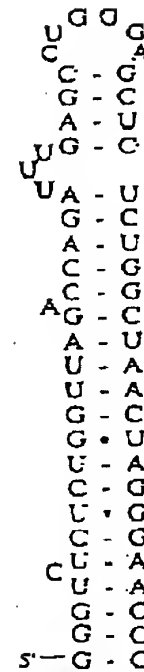


(構造中、 $N^{1a}$ および $N^{1b}$ は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 2 対の核酸塩基であり、 $N^{2a}$ および $N^{2b}$ は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^3$ および $N^4$ はそれぞれ独立に 1 または 2 個の核酸塩基であり、 $N^{5a}$ および $N^{5b}$ は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^{6a}$ および $N^{6b}$ は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 1 対の核酸塩基であり、 $N^7$ は 0 ～ 5 個の核酸塩基であり、 $N^7$ が存在しないときには、このリボ核酸は二本鎖となり、 $N^{1a}$ および $N^{1b}$ は相補的塩基対形成が可能な少なくとも 2 対の核酸塩基であり、そして実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

【請求項 2】 下記の二次構造 (II) によって表されるヌクレオチド配列からなる天然のトランス活性化応答領域リボ核酸よりも高い親和性で、ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化タンパク質と結合することができる、請求項 1 記載のリボ核酸。 ※

\* (I) によって表されるヌクレオチド配列を含むリボ核酸。

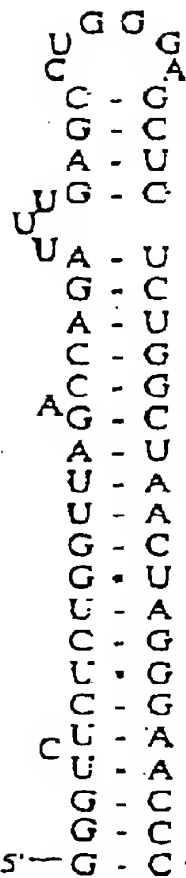
(I)



(II)

※ (構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

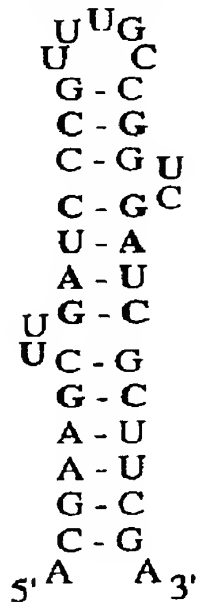
【請求項 3】 下記の二次構造 (II) によって表されるヌクレオチド配列からなる天然のトランス活性化応答領域リボ核酸よりも高い特異性で、ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化タンパク質と結合することができる、請求項 1 または 2 記載のリボ核酸。



(II)

(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

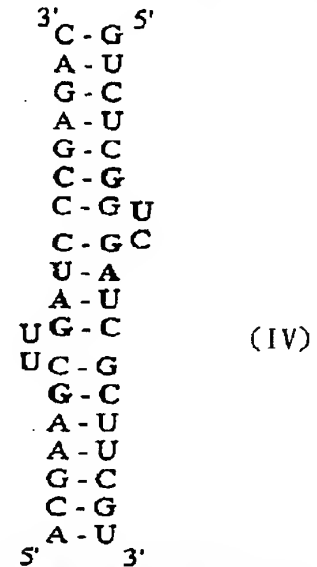
【請求項 4】 下記の二次構造 (III) によって表されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載のリボ核酸。 \*



(III)

\* (構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

【請求項 5】 下記の二次構造 (IV) によって表される二本鎖のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載のリボ核酸。



(IV)

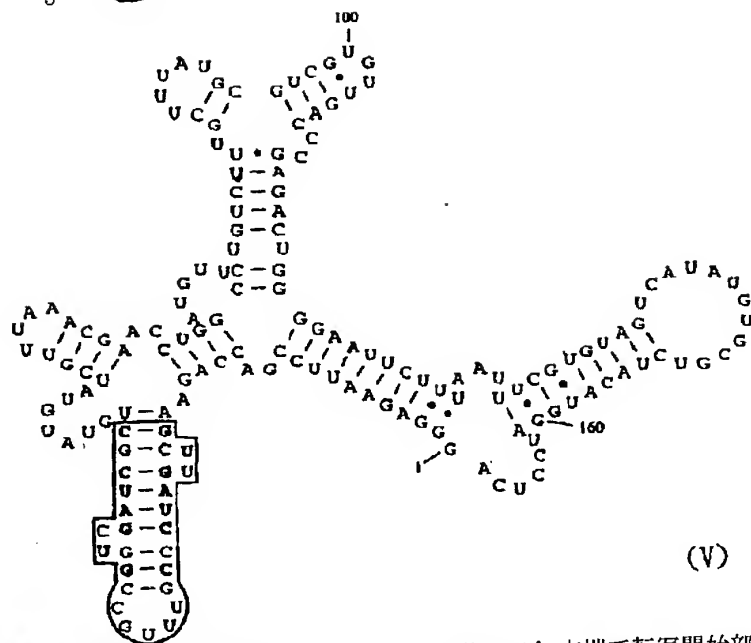
(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

【請求項 6】 下記の二次構造 (V) によって表されるヌクレオチド配列からなる、請求項 1 記載のリボ核酸。

(4)

5

6



(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

【請求項 7】 請求項 1 記載のリボ核酸を含む医薬組成物。

【請求項 8】 ヒト免疫不全ウイルスの転写を阻害するための、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】 ヒト免疫不全ウイルスに対する抗ウイルス剤として用いられる、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 10】 ヒト免疫不全ウイルスが関与する疾病を診断するための、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】 ヒト免疫不全ウイルスが関与する疾病を予防および／または治療するための、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 12】 請求項 1 記載のリボ核酸を用いて、ヒト免疫不全ウイルスの転写を阻害する方法。

【請求項 13】 ヒト免疫不全ウイルスを含む細胞に請求項 1 記載のリボ核酸を導入することを含む、請求項 12 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化タンパク質に対して高い親和性を持つ RNA に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) によってコードされる遺伝子の発現は、細胞性因子と、HIV-1 の長末端反復 (LTR) に特定の調節要素を有するウイルスのトランス活性化因子タンパク質 Tat との相互作用によって調節される (Gaynor, 1992)。HIV-1 の調節タンパク質 Tat は、トランス活性化応答領域 (TAR) と呼ばれる、LTR 領域の調節要素の 1 つと結合する (Rosen ら, 1985; Dayton ら, 1986; Fisher ら, 1986)。この領域は、全てのウイルス転

写物の 5' 末端で転写開始部位のすぐ下流に位置している (Berkhout ら, 1989)。これ (TAR) は、59ヌクレオチド (nt) からなる RNA 要素であり、これは Tat の *in vivo* 結合を可能とする安定したヘアピン構造を形成するに足る最少モチーフである (Rosen ら, 1985; Feng および Holland, 1988; Jakobovits ら, 1988)。TAR RNA に結合した後、Tat は効果的に転写を刺激する (Cullen, 1986; Peterline ら, 1986; Rice および Mathews, 1988)。TAR RNA の欠失研究は、いわゆるバルジ (bulge) 残基が Tat への特異的結合およびトランス活性化の両方にとって必須であること、他方ループ配列はトランス活性化に必要であるが Tat の *in vivo* 結合には必須ではないこと、を明らかにした (Feng および Holland, 1988; Berkhout および Jeang, 1989; Dingwell ら, 1989; Cordingley ら, 1990; Roy ら, 1990; Weeks ら, 1990)。

【0003】 Tat は 86 アミノ酸からなる小さい、システインに富んだ核タンパク質である。これは 2 つの主要なドメイン、すなわちシステインに富んだ領域および高度に塩基性の領域を持つ (Arya ら, 1985; Sodroski ら, 1985)。システインに富んだ領域はこのタンパク質の機能にとって必須であり (Garcia ら, 1988; Kubota ら, 1988)、そしてこの領域は Tat の金属結合二量体化を恐らく媒介する金属結合ドメインを有する (Frankel ら, 1988)。塩基性領域は、TAR RNA への特異的結合 (Weeks ら, 1990) および核の局在化 (Dang および Lee, 1989; Endo ら, 1989) に関与する。Tat は、それぞれの同族体 RNA を認識するためのアルギニンに富んだモチーフを含む RNA 結合タンパク質のファミリーに属する (Lazinski ら, 1989)。アルギニンに富んだ領域を含む短いペプチドは、完全なタンパク質の特異性と類似の特異性で TAR RNA に結合する (Weeks ら, 1990; Calnan

ら, 1991a)。tat 遺伝子産物は HIV-1 遺伝子のトランス活性化において重要な役割を果たすばかりでなく、宿主細胞の増殖および代謝に種々の作用を及ぼす (Ensoliら, 1990, 1993)。さらに、tat は現在 HIV-1 の効率的な逆転写にとって重要であることが知られている (Harrishら, 1997)。

【0004】tat による HIV ゲノム発現のトランス活性化の刺激に関する幾つかの研究にもかかわらず、tat が働く正確な分子作用機構はいまだにはっきりしていない。哺乳動物細胞中で tat によって誘導されるウイルス mRNA およびタンパク質の合成速度は、対照速度よりも100倍高いと推定された (Hauber および Cullen, 1988)。tat は抗ターミネーターとして、転写における延長因子として、および転写開始のエンハンサーとして機能することが報告されている (総論については、Vaishav および Wong-Staal, 1991; Cullen, 1992; Jeang ら, 1993 参照)。tat の正確な機能については議論の余地があるとしても、tat は TAR RNA に結合後、転写複合体を改変するプロモーター特異的延長因子として機能する、という合意に達したように思われる。幾つかの初期の研究は、tat による転写の刺激には細胞性転写因子と TAR RNA 配列の完全性の両方が必須であると示した (総論については、Gaynor, 1992; Jones および Peterlin, 1994 参照)。しかし、転写複合体の構成要素の組み立て (assembly) の順序は最近になるまで不明であった。tat がまず転写因子に結合して、その後 TAR RNA に結合するのか、または tat が最初に TAR RNA に結合してその後転写因子に結合するのか、が初めは不明であった。Garcia-Martinez ら (1997) は、tat タンパク質はプレ開始 (preinitiation) 複合体において RNA ポリメラーゼ II と会合し、次に動けなくなった RNA ポリメラーゼ II が TAR RNA を通過する間に複合体化 tat は TAR RNA と結合する、と示唆した。

【0005】RNA-タンパク質相互作用の最も興味をそそるもののうちに、tat 結合後の TAR RNA におけるコンホメーションの変化がある。コンホメーションの変更は、円二色性 (CD) および NMR 研究によって明確に観察された (Tan および Frankel, 1992; Puglisi ら, 1992; Aboul-ela ら, 1995, 1996)。TAR RNA のコンホメーションにおける類似の変化は、tat ペプチドを用いた場合ばかりでなく、アルギニン単独によっても達成された。しかし、リジンを用いた場合、または tat に結合できなくなった TAR の変異体を用いた場合、コンホメーションの変化は何ら観察されなかった。アルギニンの役割を知るために設計された試験において、tat 由来のペプチドおよび TAR RNA に特異的に結合するアルギニンのホモポリマー、並びに中央に1個のアルギニン残基を含むペプチドは、野性型トランス活性化を再現するのに十分であった (Calnan ら, 1991

a, b)。TAR-アルギニン複合体に関するさらなる NMR 研究は、TAR はアルギニンのための特異的結合部位を有することを示唆した (Puglisi ら, 1992)。アルギニンは1つの構造を誘導するように思われる。この構造においては、三塩基バルジにおける重要な残基 U23 が、隣接するステム (stem) の A・U 塩基対とフーグスティーン相互作用を行なう。このモデルは、TAR における U・A・U 結合を同形の C・G・C 結合に置き換えることによって支持される (Puglisi ら, 1993)。最近の修飾および突然変異誘発実験もまた、フーグスティーン相互作用が TAR の構造にとって重大であるモデルを支持する (Tao ら, 1997)。2つの異なる研究所由来の、(塩基対とは別個の) 塩基トリプル (triple) の形成に関する TAR RNA の NMR 研究の結果における食い違いにもかかわらず、TAR RNA の構造に関する一般的な意見は、主溝におけるバルジ U のおおよそその位置および TAR RNA における官能基の配向について一致している。

【0006】tat タンパク質は HIV-1 のライフサイクルおよびウイルス増殖において種々の機能を持つため、このタンパク質は HIV に対する武器を開発する上で重要かつ魅力的な標的である。過去において幾つかの遺伝子的戦略が、HIV の増殖を抑制する試みにおいて試験された。トランス優性タンパク質、一本鎖抗体、アンチセンス分子、リボザイム、デコイ (decoy) (総論については、Yu ら, 1994 参照)、および誘導可能で毒性の遺伝子産物を産生するための HIV の LTR の使用の全てが HIV に感染した細胞において試験された (Harrison ら, 1992)。これらの戦略の組み合わせ (例えば、リボザイムとデコイ) もまた検討された (Yuyama ら, 1994; Yamada ら, 1996)。このような治療的分子の発現および調節は in vivo では可能であるかもしれないが、それらの構成性発現は細胞毒性または宿主による操作された細胞への免疫応答をもたらさう。この問題は、毒素および自殺遺伝子の場合に特に重大である。HIV 感染に対する RNA に基づく種々の方法のうち、デコイ戦略は短いアンチセンス RNA およびリボザイム等の他の RNA インヒビターの使用に較べ可能性として有利な点を持っている。なぜなら、逸脱突然変異体 (escape mutant) の発生はより頻度が低いかもしれない; デコイへの結合を阻止する tat または Rev (HIV-1 タンパク質) における変更もまた、天然の要素 (例えば RRE、すなわち Rev 応答性要素、および TAR 配列) への結合を阻止すると考えられるからである。RRE および TAR RNA の両方がデコイとして利用され、そしてこれらのデコイは細胞培養物中で HIV の複製を 80%~97% 阻害した (Graham および Maio, 1990; Sullenger ら, 1990; Lisiewicz ら, 1993)。

【0007】デコイは他の分子 (アンチセンス RNA およびリボザイム等) よりもはるかに効率的なインヒビタ

一として作用するかもしれないが(ナノモル範囲以下のK<sub>d</sub>値の可能性を持つて)、もしデコイが細胞性因子を封鎖するものであるならば、特に、デコイRNAがたまたま細胞性タンパク質と相互作用できる領域を含む場合は、デコイは細胞に対して毒性でありうる。幾つかの以前の研究が、TRP-185 (Wu-Bearら, 1995)、Tat-SF1 (ZhouおよびSharp, 1996)、ポリメラーゼI (Wu-Bearら, 1995, 1996) およびその他(Shelineら, 1991; RounsevilleおよびKumar, 1992; Gatignolら, 1991) 等の細胞性因子がTAR RNAに効率的に結合することを示した。これらの研究にもかかわらず、宿主細胞の細胞機能に及ぼすTAR RNAの効果は、in vitroにおいてもin vivoにおいても詳しく分析されていない。また、これらの天然のTAR RNAよりも、HIV-1のTatタンパク質に対する親和性および特異性が高いデコイ配列は知られていない。

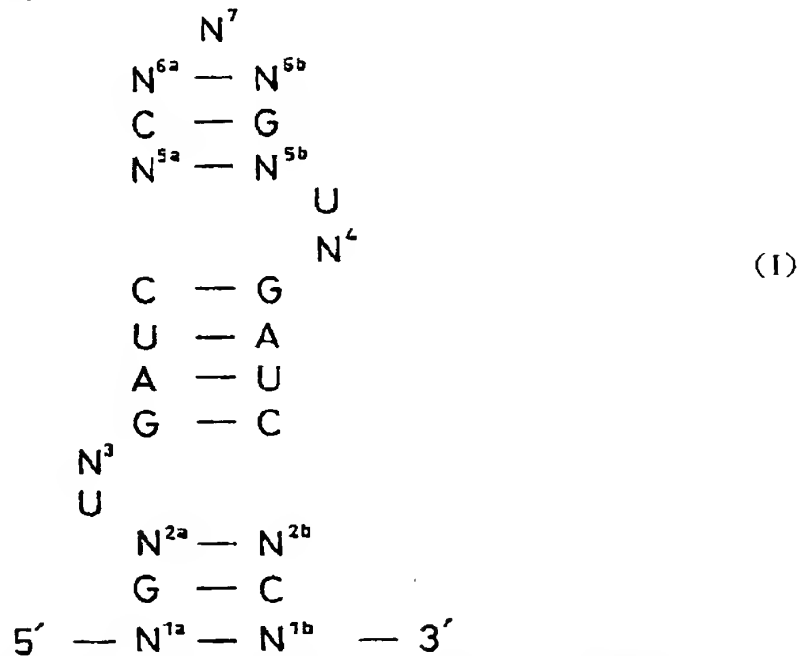
## \* 【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、HIVのTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAを提供することを目的とする。また、本発明は、そのようなRNAの利用方法を提供することも目的とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために、本発明者らは、鋭意努力した結果、HIVのTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAを合成することに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、下記の二次構造(I)を持つヌクレオチド配列を含み、HIVのTatタンパク質と結合することができるRNAを提供する。

## 【0010】

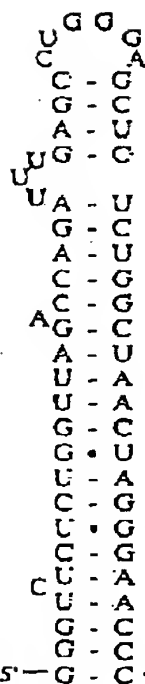


(構造中、N<sup>a</sup>およびN<sup>b</sup>は相補的塩基対形成が可能な少なくとも2対の核酸塩基であり、N<sup>a</sup>およびN<sup>b</sup>は相補的塩基対形成が可能な1対の核酸塩基であり、N<sup>a</sup>およびN<sup>b</sup>はそれぞれ独立に1または2個の任意の核酸塩基であり、N<sup>a</sup>およびN<sup>b</sup>は相補的塩基対形成が可能な1対の核酸塩基であり、N<sup>a</sup>およびN<sup>b</sup>は相補的塩基対形成が可能な少なくとも1対の核酸塩基であり、N<sup>7</sup>は1～5個の任意の核酸塩基であるか、あるいは、N<sup>7</sup>は存在しなくともよく、N<sup>7</sup>が存在しないときには、このRNAは二本鎖となり、N<sup>a</sup>およびN<sup>b</sup>は相補的塩基対形成が可能な少なくとも2対の核酸塩基であり、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

【0011】ここで、「相補的塩基対形成」とは、核酸の塩基がアデニンとウラシル、グアニンとシトシンの間で水素結合により対合することをいう。相補的塩基対形※50

※成が可能な核酸塩基対としては、アデニンとウラシル、グアニンとシトシンの組み合わせを挙げることができる。HIVとしては、HIV-1およびHIV-2が知られているが、本発明のRNAは特にHIV-1とよく結合する。本発明のRNAは、下記の二次構造(II)を持つヌクレオチド配列からなる天然のTAR RNAよりも高い親和性および/または特異性で、HIVのTatタンパク質と結合することができる。とよい。

## 【0012】

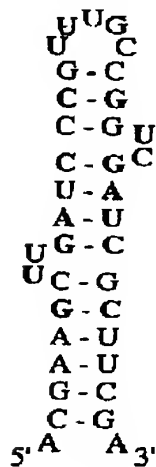


(II)

(配列番号1)

(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。) なお、HIVのTatタンパク質との親和性および特異性は、それぞれ、後述のGel-shift competitive binding assay およびTranscription assay で測定することができる。本発明のRNAの一例として、下記の二次構造(III)を持つヌクレオチド配列を含むRNAを挙げることができる。

【0013】

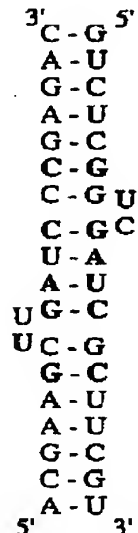


(III)

(配列番号2)

\* (構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。) 本発明のRNAの別の一例として、下記の二次構造(IV)を持つ二本鎖のヌクレオチド配列を含むRNAを挙げることができる。

【0014】



(IV)

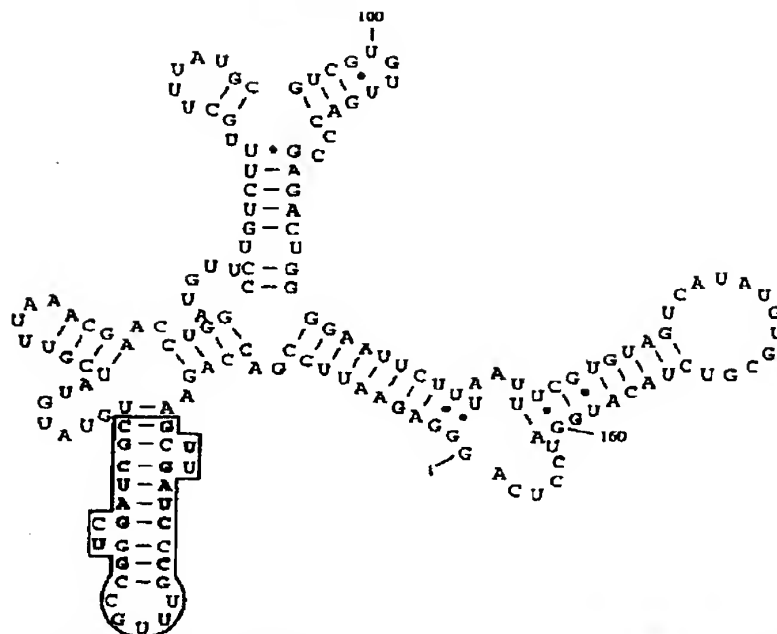
(配列番号3)

(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。) 本発明のRNAのまた別の一例として、下記の二次構造(V)を持つヌクレオチド配列からなる請求項1記載のRNAを挙げることができる。

【0015】

\*





(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

【 0 0 1 7 】

【0018】上記のようにして得られたRNAとHIV(例えば、HIV-1)のTatタンパク質との結合活性は、以下のようにして測定することができる。<sup>32</sup>P標識したRNAとTatタンパク質を1対1の割合で試験管内で混ぜた後、ニトロセルロース膜で濾過後、膜をよく洗浄後、膜に残つ

た<sup>32</sup>P量を測定する。残存RNA量／使用RNA量（％）を結合活性（％）とする。本発明のRNAは、上記の二次構造(II)を持つヌクレオチド配列からなる天然のTAR RNAよりも、HIV(例えば、HIV-1)のTatタンパク質に対する高い結合親和性を有するが、HIV-1のTatタンパク質に対する結合親和性は、以下のようにして測定することができる。

【0019】<sup>22</sup>P標識したRNA (III) (又はRNA(IV))と標識していない天然TAR RNA(II)を1対1で混ぜる。そこへ、RNA(III) (又はRNA(IV))とTAR RNAの濃度比1:1から1:200までの種々の混液を加える。更にTatタンパク質の結合領域に相当するペプチド(RE)を一定量加え、30℃ 12時間保温後ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、RNAとRNAペプチド複合体を分離し、複合体の割合を出す。タテ軸にこの複合体の割合をヨコ軸にTAR RNA/RNA(III)の比率をとったグラフを描き、50%複合体を形成する時の比率から特異性を算出する。

【0020】さらに、本発明のRNAは、上記の二次構造(II)を持つヌクレオチド配列からなる天然のTAR RNAよりも、HIV(例えば、HIV-1)のTatタンパク質に対する特異性が高いが、HIV-1のTatタンパク質に対する特異性は、以下のようにして測定することができる。HeLa細胞核抽出物中、サイトメガロウイルス(CMV)DNAを鋳型にCMVプロモーターからの転写を行う(364ヌクレオチド)。この時同時に、TAR RNA又はRNA(III)(又はRNA(IV))を添加し、転写産物の量を比較する。本発明のRNAはHIV(例えば、HIV-1)の転写阻害活性を有するが、HIV-1の転写阻害活性は以下のようにして測定することができる。HIV-1 LTRをゲノム中に組み込んだHeLa細胞に、プロモーター下流に本RNA遺伝子を持つプラスミド1とTatタンパク質を発現するプラスミド2を同時にトランスフェクトし、LTRの下流に組み込んであるルシフェレ

スの発現量を測定することにより、転写阻害活性を測定する。

【0021】HIVを含む細胞に本発明のRNAを導入することにより、該細胞中のHIVの転写を阻害することができる。例えば、本発明のRNAをリポソームに封入し、これを生体に投与して、HIVを含む細胞内に取り込ませることにより、HIVの転写を阻害することができる。このような方法については、“Lipidic vector systems for gene transfer”(1997) R. J. Lee and L. Huang Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14, 173-206.に記載されている。また、本発明のRNAをコードするDNAをウイルスなどのベクターに組み込んで、HIVを含む細胞内に導入し、該細胞内でこのベクターを発現させ、本発明のRNAを産生させることにより、HIVの転写を阻害することもできる。このような方法については、“Viral vectors in gene therapy”(1997) A. E. Smith Annu. Rev. Microbiol. 49, 807-838.に記載されている。これらの方法の詳細およびこれらの方法に用いられる材料は、遺伝子治療の分野で知られており、それらを本発明においても用いることができる。

【0022】HIVの転写を阻害することにより、HIVが関与する疾病を予防および/または治療することができる。HIVが関与する疾病としては、後天性免疫不全症候群(AIDS)を挙げることができる。投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性によるが、治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。また、本発明のRNAを用いて、HIVが関与する疾病を診断することができる。本発明のRNAを抗体の代わりに利用することができる。本発明のRNAを蛍光などで標識しておき、HIVに感染している細胞の抽出液又は細胞をつぶした物と混ぜ、ニトロセルロース膜で濾過する。HIV由来のTatタンパク質が細胞内に存在すれば、膜上にトラップされ、検出できる。

#### 【0023】

【実施例】本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

#### 【実施例1】

Tatタンパク質に高い親和性を持つRNAアプタマー(aptamer)の単離(図1)

HIV-1のTAR RNAは細胞中で幾つかの細胞性因子と結合する。上に観察されるような非関連遺伝子の転写に及ぼすその阻害効果を考えると、真のTAR RNAはTatの最も適切なアンタゴニストおよび特異的インヒビターではないかもしれない。Tatに特異的に、かつ高い親和性で結合するRNAモチーフを単離するため、本発明者らは120 nt (120 N)の大きいランダムコア配列を有するRNA分子のプールを用いた、in vitro遺伝子選択のための戦略を利用した。

【0024】第1の選択サイクルでは、約 $10^{14}$ 個のRNA配列をHIV-1 Tatタンパク質に、タンパク質のRNAに対するモル比を1:10として、結合緩衝液中で結合させた。以後のサイクルにおいては、選択のストリンジエンシーを増大させるため、TatとRNA

【上記120 N プール、特異的競合体(TAR RNA、またはTatへの約5%の結合能を有する、12~18 ntのランダムコア領域を持つ選択されたプールRNA)および非特異的競合体、すなわちtRNA】のモル比を操作した(表1)。2サイクルの各セットの選択が済むたびに、Tatへの結合を調べるフィルター結合アッセイによりRNAプールを分析した。サイクルが進むにつれ、Tatに結合した特異的RNAアプタマーのレベルはプール中で1%から9%に増加した。120 N プール中の $10^{14}$ 個の変異体は、可能性のある変異体( $10^{72}$ )の全範囲を包含することはできなかったため、第9サイクルの後に突然変異誘発PCRを導入して機能性分子の多様性を増大させた。しかし、突然変異誘発PCRの導入により、プール中の結合種の数は恐らく重要な残基の突然変異の数として減少した。したがって、本発明者らは配列分析のため第9および第11サイクル由来の産物をクローン化した。

【0025】全部で、第9および第11サイクル由来の37クローンを配列決定し、第11サイクル由来の配列を4クラスに分けた。配列の2つの主要クラス(2つの代表的配列である11G-22および11G-31を図2に示す)は、多くの配列が非関連性であった第9サイクルに比べ、第11サイクルのRNAプールに由来していた。これらのRNA配列をMfold プログラム(Zuker, 1989)により折り畳んだ時、プール中の集団の約40%に相当する15クローンがそれらのランダム化領域にTAR様モチーフ(全てのコア要素を含む)を持っていた。しかし、これらクローンの幾つかは2つのTAR様モチーフ、例えば11G-31を持つ(図2参照)。TARコア要素のコンビナトリアル分析は、各 $2.16 \times 10^5$ ヌクレオチドについて少なくとも1つの配列が見いだされるはずであると予測している(Ferbeyreら, 1997)。TARコア要素の分布のこのように低い確率にもかかわらず、本発明者らはランダムプールからTAR様の要素を、そして二重TAR要素までも、単離することができた。これは恐らく全選択手順を通して選択圧が維持されたためである。上記2つの主要クラスに属していた主な選択されたアプタマーは、HIV-1のTARが3つのバルジ残基を含むのに対し、2つのバルジ残基(UCまたはUU)を含んでいたが、人工変異による分析は少なくとも2つのバルジ残基がTatの認識に必要であることを明らかにした(WeeksおよびCrothers, 1991)。さらに、HIV-2のTAR RNAもまた、HIV-1 Tatペプチドへの効率的な結合を可能とする2つの(2個のTARモチーフ中にUUまたはUA)バルジ残基を含む(Ch

angおよびJeang, 1992)。30 nt のランダムコアを有するRNAプールを用いた同様の選択手順は、別の構造形の単離をもたらした(TuerkおよびMacDougall-Waugh, 1993)。この場合、選択は固定配列（増幅のための）にかか\*

\* 短いランダムコア領域によって妨げられたかもしれない。

【0026】

【表1】

表1. 使用したRNAおよびタンパク質の濃度、並びに各選択サイクル後のRNA

プールのTatとの結合能

サイクル 数	濃度				結合能*	
	Tat	プールRNA	tRNA	RNA*	NP	P
	$\mu\text{M}$				%	
1	0.50	5.0	-	-	0	2
2	0.50	1.5	3	1	0	4
3	0.50	1.5	5	5	0	5
4	0.50	3.0	10	10	0	4
5	0.50	1.5	40	7	0	6
6	0.50	5.0	50	10	0	5
7	0.50	3.0	50	7	0	6
8	0.50	5.0	50	14	0	7
9	0.50	5.0	50	14	0	9
10	0.33	5.0	50	14	0	7
11	0.17	2.5	25	7	0	9

【0027】\*Tatタンパク質の存在下(P)または不在下(NP)で結合アッセイを実施した。Tatおよび異なるサイクル由来の個別に標識したRNAプールの両方を共にインキュベートし、次に10倍過剰の非特異的競合体(tRNA)の存在下で100  $\mu\text{l}$ の結合緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl]中でのin vitro選択の際に用いたのと類似の条件下で濾過した。\*特異的RNA競合体(実験手順参照)。

【0028】【実施例2】ミニ11G-31 RNAはTat由来ペプチドと効率的に結合する。アルギニンに富む領域を含む短いペプチドは、完全なタンパク質の特異性に類似した特異性でTAR RNAに結合するので(Weeksら, 1990; Calnanら, 1991a)、本発明者らは以後の試験においてCQ(アミノ酸37~72)およびRE(アミノ酸49~86)ペプチドの両方を用いた。これらのペプチドは化学的に合成し、均質(純度>95%)になるまで逆相HPLCにより精製した。

【0029】最初に、各クラス由来の代表的クローンを、Tat由来ペプチド(CQまたはRE; 実験手順参照)および真のTAR RNAの存在下で競合結合アッセイにかけた。TAR様モチーフを2個持つRNAモチーフ(11G-31 RNA等)のみが、Tatペプチドへの結合についてTARと競合するように思われた(データは本明細書には示していない)。11G-31

RNA(Tatペプチドに高い親和性を持つRNA分子の1つ)における結合領域を突き止めるため、本発明者らはTAR様モチーフを2個有する最小RNA(ミニ11G-31; 37量体)を化学的に合成し、天然のゲルを用いてTatペプチドへのその結合を分析した。C

QおよびREの両ペプチドはミニ11G-31 RNAに効率的に結合した(図3AおよびB参照)。

【0030】アプタマー、ミニ11G-31およびTAR RNAのCQおよびREペプチドとの結合親和性を比較するため、本発明者らは結合アッセイを実施した。このアッセイでは、標識したRNAを種々の濃度のCQまたはREペプチドと共にインキュベートし、次に20%の非変性ポリアクリルアミドゲルを用いて複合体化RNAおよび遊離のRNAを分離した(図3A参照)。形成された各複合体の量をゲル上のバンドの強度から直接計算した。真のTAR RNAは、56 nM CQペプチドの存在下で約50%のレベルで複合体を形成した(図3A-1参照)。他方、ミニ11G-31 RNAは、CQペプチドの濃度が14 nMでも同じ量の複合体を効率的に形成した(図3A-3参照)。REペプチドを用いて同様の分析を行なった時、真のTAR RNAは23 nM REペプチドの存在下で約50%のレベルで複合体を形成した(図3A-2参照)。他方、ミニ11G-31 RNAは、REペプチドの濃度が3 nMでも同じ量の複合体を形成した(図3A-4参照)。これらの結果は、選択されたアプタマーがTatペプチドに高い親和性を有していたことを示唆する。

【0031】バルジ残基の重要性を評価するため、本発明者らはミニ11G-31 RNAにおいてバルジ残基を欠くRNAを合成し、CQおよびREペプチドを用いたゲルシフトアッセイによってこのRNAの結合を分析した。CQペプチドの高濃度においても(200 nM)、複合体は全く形成されなかった(図3B-1参照)。しかし、REペプチドの高濃度において(>80 nM)、少量の

複合体が形成された(図3B-2参照)。真のTAR RNAおよびバルジ突然変異RNAを用いて同様の実験を実施し、REおよびCQペプチドへの結合を調べた。そして、本発明者らはREペプチドに較べてCQペプチドは効率的にバルジ変異体を区別することを観察した。この結果は以前の観察と一致していた(Churcherら, 1993)。これらの試験から、ミニ11G-31におけるバルジ残基はTatペプチドの認識にとって重要であるように思われる。

【0032】本発明者らの種々の試験は、TAR RNAのコア要素が2つの主要クラスに属する単離されたアプタマー中に良く保存されていることを示し、このことは保存された残基の重要性を示唆していた。選択されたRNAの配列、すなわち一重または二重TARモチーフを含む配列は、真のTAR RNAのTatとの結合に必要であると以前に同定されたコア要素全ての詳細を確認する。ミニ11G-31 RNAからのバルジ残基の削除は、Tatタンパク質の結合を完全に廃止した。さらに、バルジU残基が一重および二重TARモチーフ中に見いだされた。このモチーフは恐らく、(ワトソン-クリック型に結合した)A-U残基と共にフーグスティーン型塩基対を形成して、アルギニンまたはTatペプチドおよびTAR RNAの複合体として提案されている塩基トリプルU・A・Uを形成する。これらを考え合わせると、Taoら(1997)の最近の突然変異による結果、および本発明者らのこの度の結果は、TARのアルギニン結合モチーフは5' UXnGA(ここで、U残基はA残基とフーグスティーン相互作用をなすと予想され、Xnは塩基対を形成していない少なくとも1個のヌクレオチドを示し、G残基はアルギニンの結合のためのポケットを形成する)と要約できることを示唆する。

【0033】〔実施例3〕Tatペプチドに対するTARおよびミニ11G-31の相対的親和性の比較真のTAR RNAおよびミニ11G-31 RNAを種々の量のTatペプチドで力価測定した場合、アプタマーが効率的にTatペプチドに結合するのが観察された。次に、本発明者らは真のTAR RNAおよびミニ11G-31 RNAの親和性を直接比較するために競合結合アッセイを実施した。標識化アプタマーおよびTAR RNAを1:1の比で種々のモル比(40~8,000 nMの範囲)の非標識アプタマーおよびTAR RNAと共に、80 nMのREペプチドの存在下でインキュベートした。反応混合物を30℃で12時間平衡化させ、20%の非変性ポリアクリルアミドゲル上で分析した。アプタマーとREペプチドによって形成された複合体の量を種々の比について計算し、その結果、本発明者らはモル比が1対8(ミニ11G-31:TAR=40 nM:3,200 nM)の時、アプタマー-ペプチド複合体の量が50%減少することを見いだした。これらの結果は、アプタマーのREペプチドに対する親和性が、真のTAR RNAの親和性

よりも80倍高い(DI/2≒3.2μM)かもしれないことを示唆していた。対照的に、非標識アプタマーの非標識TAR RNAに対するモル比が1:1の場合、TAR-ペプチド複合体は全く検出されなかった。より初期の研究においては、HIV-1のアルギニンに富んだ領域に由来するペプチドは、16 pMから40 nMの濃度で真のTAR RNAに結合するように思われた(Churcherら, 1993; LongおよびCrothers, 1995)。Tatペプチドの力価測定、および競合結合アッセイの両方の結果は、単離されたアプタマーはTat/TAR相互作用を妨げたばかりでなく、ナノモル以下の濃度でTatペプチドを効率的にトラップしたことを示唆している。この特性は、ウイルスタンパク質の効果的なデコイにとって明らかに望ましい。

【0034】〔実施例4〕二重TAR様RNAモチーフはTatペプチドへの親和性を増強した。Tatペプチドとの効率的な結合における二重TAR様RNAモチーフの重要性を明確に規定するため、本発明者らは二本の鎖を分離し、ループ配列を削除した(図5参照)。化学的に合成した2つの5'および3'オリゴマー(20量体)をアニーリングすることにより、ミニ11G-31 RNAを模倣することができる二本鎖RNA Iを調製した。3' ΔUCおよび5' RNAオリゴマーをアニーリングすることにより、二本鎖RNA II(3' バルジ残基UおよびCが欠失している)を調製した。3' および5' ΔUUオリゴマーをアニーリングすることにより、二本鎖RNA III(5' バルジ残基UUが欠失している)を調製した。二本鎖RNA IV(バルジ残基の両方の対が欠失している)を調製するため、3' ΔUCおよび5' ΔUUオリゴマーの両方をアニーリングした。各二本鎖のオリゴマーの5' 末端を標識した後、各二本鎖を用いてCQペプチド(40 nM)を結合緩衝液中で30℃で1時間平衡化した。生成物を非変性ポリアクリルアミドゲル上で分析し(図6参照)、各複合体の量を上記のように計算した。両方のバルジを含む二本鎖構造物(二本鎖RNA I)は、40 nMの濃度で約80%のレベルで複合体を形成し、またミニ11G-31 RNAは類似した量の複合体を形成した。3' 末端バルジ残基U(二本鎖RNA II)(図6、レーン8)または5' 末端バルジ残基UC(二本鎖RNA III)(図6、レーン10)の削除は、CQペプチドとの間に形成される複合体の量を約50%減少させた。二本鎖中のバルジ残基の両方の対を削除する(二本鎖RNA IV)と、CQペプチドの存在下で複合体は全く形成されなかった(図6、レーン4)。得られた結果は、複合体におけるペプチドに対するアプタマーの比は1対1であったこと、およびバルジ残基の両方の対がCQペプチドとの効果的な結合において実際に重要な役割を果たしたことを示唆する。

【0035】〔実施例5〕

無細胞転写アッセイにおけるミニ11G-31 RNA

の効果

関係のない鋳型の転写に及ぼす単離したアプタマー（ミニ11G-31）の効果を調べるため、本発明者らはHeLa細胞核の抽出物を用いて転写アッセイを実施した（図7参照）。外因性の真のTAR RNA（100 pmole）の添加は、CMVに由来する鋳型の転写を約50～60% 阻害した（図7、レーン3および4）（Yamamotoら, 1997）。100 pmole の tRNA（酵母由来の全 tRNA）の不在下（図7、レーン1）または存在下（図7、レーン2）、および100 pmole のミニ11G-31 RNAの存在下（図7、レーン5）におけるCMVプロモーターからの転写は、影響を受けなかったか、あるいはわずかに影響されたのみであった。3つの独立した転写実験の結果を定量化したところ、TAR RNAのみが有意義な程度まで転写を阻害したことが明らかになった（図8参照）。このように、単離されたアプタマーは、真のTAR RNAに較べて高い親和性でTatペプチドに結合した。そして該アプタマーは、in vitroにおける転写結果から判断されるように、関係のない遺伝子の転写に何らネガティブな影響を及ぼさなかった。したがって、ミニ11G-31 RNAはTat特異的デコイとして非常に有用であると思われる。

#### 【0036】結論

in vitro遺伝子選択という戦略を用いて、本発明者らはHIV-1のTatタンパク質に高い親和性を持つRNAアプタマー11G-31を単離した。全長11G-31 RNAおよびミニ11G-31の両方が、類似した効率でTatペプチドと結合するようである。単離されたアプタマーは、互いに向かい合った、2つのTAR様RNAモチーフを持っており、これらのモチーフはアプタマーとTatペプチドとの高親和性結合を助けることが判明した。真のTAR RNAは転写を阻害するのに対して、アプタマーは転写への阻害作用がないことから、ミニ11G-31 RNAはHIV-1感染における可能性のあるTatデコイとしてのさらなる分析にかきたてる魅力的な分子であると言える。上記の実施例において行った種々の実験の手順を以下に示す。

【0037】〔TARおよび突然変異体TAR RNAの調製〕DNA合成装置（392A型、Applied Biosystems, USA）を用いて、T7プロモーターおよび図1に示すRNAに対応する配列を含むオリゴデオキシリボヌクレオチド鋳型を合成した。リバースプライマー 5'-GGGTTCCTAGTTAGCCAGA-3'（配列番号5）の存在下で、Taq DNAポリメラーゼ（Nippon Gene, Japan）により一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを二本鎖DNAに変換した。各反応は、10 mM Tris-HCl（pH 8.8）、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100、0.2 mM dNTPs、100 pmole のリバースプライマー、78 pmole のDNAオリゴヌクレオチド、および2.5 単位のTaq DNAポリメラーゼ（Takara, Japan）を含む100 μlの混合物中で実

施した。この反応混合物を、所望のサイズの産物が得られるまで、94℃で1分間、45℃で1分間、および68℃で2分間からなるサイクルにかけた。得られたdsDNA鋳型をエタノール中で沈殿させ、T7 RNAポリメラーゼによって転写させてTAR RNAまたは突然変異体TAR RNAを生成させた。in vitroにおける転写は、T7 Ampliscribe kit（Epicentre Technologies, USA）を用いた37℃で2時間のインキュベーションの間に完了した。RNAを合成し、DNアーゼIで処理した後、10% 変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動（PAGE）によって反応混合物を分画した。エタノール沈殿の後、RNAをゲルから抽出し、回収した。

#### 【0038】〔TAR RNAおよびミニ11G-31

RNAの存在下におけるin vitro転写アッセイ〕転写レベルにおけるTAR RNAの細胞機能に及ぼす効果を調べるため、本発明者らはエンハンサー要素を含む、または欠くサイトメガロウイルス（CMV）即時型初期プロモーター（immediate early promoter）を用いた。本発明者らは、鋳型のLTR非依存性転写に及ぼすTAR RNAの効果を評価するための鋳型として、1例としてCMV DNAを選んだ。特異的プライマー[5'-TTAGTCATCGCTATTACCATGG-3'（配列番号6）および5'-AGGCCCTGGATTCACAGGACGGGTG-3'（配列番号7）]を用いて、Taq DNAポリメラーゼにより、PCR（94℃3分間、50℃1.15分、および72℃3分間；30サイクル）によって、CMV初期プロモーター領域（nt -238から364）を増幅した。得られたPCR産物（602 nt）をエタノール沈殿により回収し、転写アッセイに使用した。[α-<sup>32</sup>P]CTPの存在下で、HeLa細胞核の抽出物（Promega, USA）を用いて転写反応を実施した。まず13単位の核抽出物、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.4 mMの各ATP、GTPおよびUTP、および16 μM CTP、並びに10 μCi [α-<sup>32</sup>P]CTP（3,000 Ci/mmol; Amersham, U.K.）を緩衝液[20 mM HEPES（pH 7.9）、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTTおよび20% グリセリン]中で混合し、これを100 pmole のTAR RNA、ミニ11G-31 RNA、または酵母由来の全 tRNA（Boehringer Mannheim, Germany）と混合し、30℃で15分間平衡化させた。この反応混合物にPCRのための鋳型DNA 100 ngを補充し、最終反応容量を25 μlとし、30℃でさらに45分間インキュベーションを継続した。175 μlの停止溶液[0.3 M Tris-HCl（pH 7.4）、0.3 M 酢酸ナトリウム、0.5% SDS、2 mM EDTA および3 mg/ml の tRNA]を添加して反応を停止させ、エタノール中で沈殿させる前に反応産物をいったんフェノールおよびクロロホルムで抽出した。新たに合成されたRNAをローディング緩衝液[25 mM EDTAおよび4.5 M 尿素]中で90℃で5分間変性させ、7 M 尿素を含有する6% ポリアクリルアミドゲルにのせ、電気泳動によって分画した。イメージアナライザー（BAS 2000; Fuji Film, Japan）を用いてゲル上のバンドを定量した。

【0039】〔T a t 由来ペプチドの合成およびゲルシフトアッセイ〕 T a t タンパク質のアルギニンに富んだ領域にまたがる2個のT a t 由来ペプチドを化学的に合成した。すなわち、C Q (アミノ酸37~72、CFTTKALGIS YGR KRRRQRRPPQGSQTHQVSLSKQ (配列番号8)、36量体) およびR E (アミノ酸49~86、RKKRRQRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE (配列番号9)、38量体) である。これらのペプチドをH P L Cにより精製し、加水分解の後、逆相H P L Cによりそれらの組成を確認した。

【0040】C Q ペプチドを、8  $\mu$  l の結合反応液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、70 mM NaCl、2 mM EDTA、40 n M 酵母由来全 t R N A (Boehringer) および0.01% Nonide t P-40 (Shell Chemicals, USA)] 中で5' 標識化T A R または変異体に対して力価測定した。最初に、各標識化T A R R N A を94℃で2分間変性させ、種々の濃度のペプチドと混合する前に室温で10分間平衡化させた。混合物を30℃で1時間インキュベートし、15% 非変性ゲルを用いてP A G Eによって複合体と遊離のR N A を分離した。イメージアナライザーを用いてゲル上の各複合体の量を定量した。

【0041】〔T a t タンパク質およびR N A プール〕本発明者らが選択のために用いたH I V-1のT a t タンパク質は、RepliGen (USA) から購入した。最初に、HeL a細胞核抽出物を用いた無細胞転写アッセイにおいて、このT a t タンパク質のL T R依存性トランス活性化を試験した。その結果、上記調製物は効率的にトランス活性化を支持することが示された。また、T A R との効率的な結合についても上記調製物を分析した。その特性より、本発明者らは上記調製物は高純度の (>90%) 活性T a t タンパク質を含んでいると推論した。

【0042】プール中のR N A は、増幅のための2つの定常領域に挟まれた120 nt (N) のランダムコア領域を以下のように含んでいた (Ellington およびSzostak, 1992): 5' --GGGAGAAUCCGACCAAGCUU--120N--CAUAUG UGCG UCUACAUGGAUCCUCA--3' (配列番号10)。プールの増幅に用いたプライマーは、5' -AGTAATACGACTCACTATAGGGAGA ATTCCGACCAAG-3' (39.169と称する; 配列番号11) および5' -TGAGGATCCATGTAGACGCACATA-3' (24.169と称する; 配列番号12) であった。選択サイクルにおいては、非特異的競合体として酵母 t R N A (Boehringer Mannheim) を用いた。

【0043】〔in vitro選択〕 in vitro選択のため本発明者らが従ったプロトコールは、Urvilら (1997) によって報告されたものにほぼ同じである。第1の選択サイクルは、5.0  $\mu$  M (最終濃度) のR N A (約4 x 10<sup>13</sup>個のR N A 配列に相当する) および0.5  $\mu$  M T a t タンパク質 (H I V-1) を含有する結合緩衝液中で実施した。T a t タンパク質とプールR N A を混合する前に、最初にプール中のR N A を結合緩衝液中で90℃で2分間変性させ、次に室温で10分間冷却して異なる構造異性体の平衡

化を促進した。文献に記述されているように (Urvilら, 1997) 反応混合物を1時間インキュベートして濾過した。次の5サイクルの各々が終わる度に、プールR N A の濃度を操作し、徐々に濃度を上げた非特異的R N A

(大腸菌 t R N A) および特異的競合体R N A (+18 から+44 までのヌクレオチドを含むT A R R N A) の存在下で60サイクルまでプールR N A をT a t との結合について競合させた。第7から第11サイクルで、プールR N A をさらに別の競合体R N A の特異的プール [選択されたプール (12~18 N プール、約5%のT a t 結合能を有する)] と競合させた。最後の2サイクルでは、T a t タンパク質の濃度を有意に低下させた。結合緩衝液は、50 mM Tris-HCl (pH 7.8) および50 mM KCl からなっていた。プールO R N A を、“Pop-top”フィルターホルダー (Nucleopore, USA) に装着した、あらかじめ湿らせたニトロセルロースアセテートフィルター (HAWP フィルター、0.45  $\mu$  m、直径 13.0 mm; Millipore, USA) を用いて前濾過し、選択的にフィルターと結合したR N A を選択した。この前濾過は、各付加的サイクルの後で実施した。1 ml の結合緩衝液を用いて洗浄することにより、各選択サイクル後、T a t -R N A 複合体をフィルター上に集めた。0.4 M 酢酸ナトリウム、5 mM EDTA および7 M 尿素 (pH 5.5) を90℃で5分にわたって用いて、結合したR N A をフィルターから溶離した。エタノール沈殿の後、AMV 逆転写酵素 (Seikagaku, Japan) およびT a q DNAポリメラーゼ (Nippon Gene) をそれぞれ用いて、逆転写およびP C Rによる増幅を文献に記述されているように実施した (Urvilら, 1997)。

【0044】さらに、第9、10および11サイクルでは突然変異誘発性P C Rプロトコール (Leungら, 1989) も採用した。これらのサイクルでは、c DNA反応混合物の半分を先に記述したように増幅し、残りの半分は100  $\mu$  l のP C R反応混合物 [67 mM Tris-HCl (pH 8.8)、16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、6.1 mM MgCl<sub>2</sub>、6.7 mM EDTA (pH 8.0)、0.17 mg/ml BSA、10 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、1% DMSO、0.2 mM dATP、各1 mMのdCTP、dGTPおよびdTTP、0.5 mM MnCl<sub>2</sub>、5 UのT a q DNAポリメラーゼおよび0.4 mMの各プライマーを含む] 中で増幅した。反応混合物を、適切なサイズの産物バンドが生成されるのに必要なサイクル数だけ、94℃で1.15分間、50℃で1.15分間および72℃で2.15分間からなる増幅サイクルにかけた。T 7 R N Aポリメラーゼを用いた転写に先立って、このP C Rによる産物 (約0.25  $\mu$  g) を標準的P C Rの産物 (約1.0  $\mu$  g) と混合した。

【0045】第11選択サイクルの後、P C Rの産物をIn vitrogenによって提供されたプロトコールに従って直接pCRIIベクター (Invitrogen, USA) に連結した。アルカリ溶解法によって各クローンからDNAを単離し、Dye Terminator Sequencing Kit [Applied Biosystems Inc. (ABI)] を用いてDNAシーケンサー (373A型; ABI)

により配列を決定した。

【0046】〔フィルター結合アッセイ〕異なる選択サイクルからのプールRNAの結合活性および各アプタマーの結合活性を評価するため、0.5  $\mu$ Ci/ml [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTPを用いて内部標識されたRNAを調製した。結合およびin vitro転写の条件は、RNAのTatに対するモル比を1:1 (330 nM:330 nM)とした以外は、選択に用いた条件と同じであった。1mlの結合緩衝液を用いてフィルターを洗浄し、空気乾燥し、イメージアナライザー(BAS2000)を用いてフィルター上の放射能を定量した。結合が特異的なことを確実にするために、10倍モル過剰のtRNAを非特異的競合体として各結合反応に添加した。

【0047】〔ゲルシフト競合結合アッセイ〕5'末端標識化ミニ11G-31 RNAおよびTAR RNAを最初1:1のモル比で混合した。非標識ミニ11G-31 RNAおよびTAR RNAを用いて濃度を調製した後、ミニ11G-31 RNA対TARの種々の比(1:1から1:200の範囲)を準備した(40 nM ミニ11G-31および40~8,000nMまで徐々に増大する濃度のTAR RNA)。両方のRNAを94℃で2分間変性させ、次に周囲温度で平衡化させた。次にRNAサンプルを30℃で12時間80 nM REペプチドと結合させ、平衡点におけるRNA-タンパク質複合体の定量を可能とした。反応生成物を非変性ゲル上で分離し、2つのRNAによって形成された複合体の量を分析した。第11選択サイクルからの各アプタマーを特徴づけるため、本発明者らは同様の競合結合アッセイを実施した。このアッセイでは、各RNA(10~100 nM)を100nM CQペプチド\*

配列:

GGGUCUCUCU GGUUAGACCA GAUUUGAGCC UGGGAGCUCU CUGGCUAACU AGGGAACCC 59

【0051】配列番号: 2

配列の長さ: 37

配列の型: 核酸

配列:

ACGAAGCUUG AUCCCGUUUG CCGGUCGAUC GCUUCGA 37

【0052】配列番号: 3

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成RNA

配列:

ACGAAGCUUG AUCCCGAGAC

【0053】配列番号: 4

配列の長さ: 165

配列の型: 核酸

配列:

GGGAGAAUUC CGACCAGAAG CUUGAUCCCG UUUGCCGGUC GAUCGUGUA UGUAUCGUUU 60

AAACGAACCU GGAUGUCCU GUCUUUGCUU UAUGCGUCGU GUUGACCCGA GACUGGGGAA 120

\*の存在下で真のTARと競合させた。

【0048】〔ミニ11G-31 RNA二本鎖の合成〕Tat由来ペプチド(CQ)との効率的結合のための11G-31の二重TAR様モチーフの重要性を確立するために、オリゴリボヌクレオチドの4本の鎖を化学的に合成し、ミニ11G-31 RNAからループ配列を削除した後、4つの二本鎖RNAを調製した。それらの配列は以下の通りである: 5' RNAオリゴ(5'-ACG AAGCUUGAUCCCGAGAC-3' (配列番号3))、3' RNAオリゴ(5'-GUCUCGGGUAUCGCUUCGU-3' (配列番号13))、5'  $\Delta$ UU RNAオリゴ(5'-ACGAAGCGAUCCCGAGAC-3' (配列番号14))、および3'  $\Delta$ UC RNAオリゴ(5'-GUCUCGGGUAUCGCUUCGU-3' (配列番号15))。これらのオリゴの官能基を確立されたプロトコール(ABIマニュアル)により脱保護し、20% ポリアクリルアミドゲルを用いて精製した。

【0049】

【発明の効果】本発明により、HIV-1のTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAが提供された。このRNAは、HIV-1の転写阻害に利用することができる。

【0050】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 59

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ゲノムRNA

※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

※配列の種類: 他の核酸 合成RNA

★配列の特徴:

存在位置: 8..9

他の情報: 相補鎖が存在しない

40 存在位置: 13..14

他の情報: 相補鎖は3'→5'方向にこの位置からのびる一

★本鎖RNA「3'-CU-5'」を有する

☆鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

☆配列の種類: 他の核酸 合成RNA



27

28

UUCUUUAAUU UCGUGUAGUC AUAUGUGCGU CUACAUGGAU CCUCA

【0054】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

GGGTTCCCTA GTTAGCCAGA

\* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

20

【0055】配列番号：6

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列：

TTAGTCATCG CTATTACCAT GG

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

22

【0056】配列番号：7

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列：

AGGCCTGGAT TCACAGGACG GGTG

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

24

【0057】配列番号：8

配列の長さ：36

配列の型：アミノ酸

配列：

Cys Phe Thr Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg

16

Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser

32

Leu Ser Lys Gln

36

☆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

☆

【0058】配列番号：9

配列の長さ：38

配列の型：アミノ酸

配列：

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr

16

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp

32

Pro Thr Gly Pro Lys Glu

38

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

◆

【0059】配列番号：10

配列の長さ：169

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

GGGAGAAUUC CGACCAGAAG CUUNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 60

NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 120

NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNCAUAUGU GCGUCUACAU GGAUCCUCA 169

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：unsure

存在位置：24..143

【0060】配列番号：11

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列：

AGTAATACGA CTCACATATAG GGAGAATTCC GACCAGAAG

39

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0061】配列番号：12

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列：

TGAGGATCCA TGTAGACGCA CATA

24

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0062】配列番号：13

50 配列の長さ：20



配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

配列：

GUCUCGGUCG AUCGCUUCGU

【0063】配列番号：14

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列：

ACGAAGCGAU CCCGAGAC

【0064】配列番号：15

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列：

GUCUCGGGAU CGCUUCGU

【0065】参考文献

Aboul-ela, F., Karn, J., and Varani, G. (1995). The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J. Mol. Biol.* 253, 313-332.

Aboul-ela, F., Karn, J., and Varani, G. (1996). Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals as a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res.* 24, 3974-3982.

Arya, S.K., Guo, C., Joseph, S.F., and Wong-Staal, F. (1985). Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229, 69-73.

【0066】Berkhout, B., Silverman, R.H., and Jeang, K.T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59, 273-282.

Berkhout, B., and Jeang, K.T. (1989). Trans-activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence-specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J. Virol.* 63, 5501-5504.

Berkhout, B., and Jeang, K.T. (1991). Detailed mutational analysis of TAR RNA: critical spacing between the bulge and loop recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 19, 6169-6176.

【0067】Bohjanen, P.R., Colvin, R.A., Puttaraju, M., Been, M.D., and Garcia-Blanco, M.A. (1996). A small circular TAR RNA decoy specifically inhibits Tat-activated HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res.* 24, 3733-3738.

Calnan, B.J., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A.D. (1991a). Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.* 5, 201-210.

\* トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：他の核酸 合成RNA

20

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成RNA

18

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成RNA

18

Calnan, B.J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A.D. (1991b). Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 252, 1167-1171.

【0068】Chang, Y.-N., and Jeang, K.-T. (1992). The basic RNA-binding domain of HIV-2 Tat contributes to preferential trans-activation of a TAR-2-containing LTR. *Nucleic Acids Res.* 20, 5465-5472.

Churcher, M.J., Lmont, C., Hamy, F., Dingwell, C., Greem, S.M., Lowe, A.D., Butler, P.D.G., Gait, M.J., and Karn, J. (1993). High-affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus Tat protein requires amino acid residues flanking the basic domain and base pairs in the RNA stem. *J. Mol. Biol.* 230, 90-110.

30 Cordingly, M.G., La Femina, R.L., Callahan, P.L., Condra, J.H., Sardana, V.V., Graham, D.J., Nguyen, T.M., Le Grow, K., Gotlib, L., Schlabach, A.J., and Colonno, R.J. (1990). Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the trans activation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8985-8989.

【0069】Cullen, B.R. (1986). Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 46, 973-982.

40 Cullen, B.R. (1992). Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Micobiol. Rev.* 56, 375-394.

Dang, C.V., and Lee, W.M.F. (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 18019-18023.

【0070】Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C., and Haseltine, W.A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotrop

ic virus type III is required for replication. *Cell* 44, 941-947.

Dingwell, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M., S. Kinner, M. A., and Valerio, R. (1989). Human immunodeficiency virus 1 Tat protein binds trans-activation-response region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8985-8989.

Ellington, A. D., and Szostak, J. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 355, 850-852.

【O O 7 1】Endo, S.-I., Kubota, S., Siomi, H., Adachi, A., Oroszlan, S., Maki, M., and Hatanaka, M. (1989). A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. *Virus Genes* 3, 99-110.

Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S. Z., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 344, 84-86.

Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R. A., Wingfield, P., and Gallo, R. C. (1993). Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral trans-activation. *J. Virol.* 67, 277-287.

【O O 7 2】Feng, S., and Holland, E. C. (1988). HIV-1 Tat trans-activation requires the loop sequence within TAR. *Nature* 334, 165-167.

Ferbeyre, G., Bourdeau, V., and Cedergren, R. (1997). Does HIV tat protein also regulate genes of other viruses present in HIV infection? *Trends in Biochem. Sci.* 22, 115-116.

Fisher, A. G., Feinberg, M. B., Josephs, S. F., Harper, M. E., Marselle, L. M., Reyes, G., Gonda, M. A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1986). The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320, 367-371.

【O O 7 3】Frankel, A. D., Bredt, D. S., and Pabo, C. O. (1988). Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* 240, 70-73. Garcia, J. A., Harrich, D., Pearson, L., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R. (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.* 7, 3143-3147.

Garcia-Martinez, L. F., Ivanov, D., and Gaynor, B. (1997). Association of Tat with purified HIV-1 and HIV-2 transcription preinitiation complexes. *J. Biol. Chem.* 272, 6951-6958.

【O O 7 4】Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang, K.-T. (1991). Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251, 1597-1600.

Gaynor, R. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* 6, 347-363.

Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., and Yarus, M. (1995). Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 763-797.

【O O 7 5】Graham, G. J., and Maio, J. J. (1990). RNA transcription of the human immunodeficiency virus trans-activation response element can inhibit action of the viral trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5817-5821.

Harrich, D., Hsu, C., Race, E., and Gaynor, R. B. (1994). Differential growth kinetics are exhibited by human immunodeficiency virus type 1 TAR mutants. *J. Virol.* 68, 5899-5910.

Harrich, D., Ulich, C., Garcia-Martinez, L. F., and Gaynor, R. B. (1997). Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* 16, 1224-1235.

【O O 7 6】Harrison, G. S., Long, C. J., Curiel, T. J., Maxwell, F., and Maxwell, H. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-1-regulated diphtheria toxin A chain gene. *Hum. Gen. Ther.* 3, 461-469.

Hauber, J., and Cullen, B. R. (1988). Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* 62, 673-679.

Jakobovits, A., Smith, D. H., Jakobovits, E. B., and Capon, D. J. (1988). A discrete element 3' of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV transactivator. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2555-2561.

【O O 7 7】Jeang, K. T., Berkhout, B., and Dropulic, B. (1993). Effects of integration and replication on transcription of the HIV-1 long terminal repeat. *J. Biol. Chem.* 268, 24940-24949.

Jones, K. A., and Peterlin, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 717-743.

Kubota, S., Endo, S.-I., Maki, M., and Hatanaka, M. (1988). Role of cysteine-rich region of HIV Tat protein in its trans-activation ability. *Virus Genes* 2, 113-118.

【O O 7 8】Lazinski, D., Grzadzielska, E., and Das, A. (1989). Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59, 207-218.

Leung, D.W., Chen, E., and Goeddel, D.V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segments using a modified polymerase chain reaction. *J. Methods Cell and Mol. Biol.* 1, 11-15.

Liszewicz, J., Sun D., Smythe, Lusso, P., Lori, F., Louie A., Markham, P., Rossi, J., Reitz, M., and Gallo, R.C. (1993). Inhibition of human immunodeficiency virus type I replication by regulated expression of a polymeric Tat activation response RNA decoy as a strategy for gene therapy in AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8000-8004.

【O O 7 9】Long, K.S., and Crothers, D.M. (1995). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat-derived peptides with TAR RNA. *Biochemistry* 34, 8885-8895.

Marciniak, R.A., Calnan, B.J., Frankel, A.D., and Sharp, P.A. (1990). HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro. *Cell* 63, 791-802.

Osborne, S.E., and Ellington, A.D. (1997). Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* 97, 349-370.

【O O 8 0】Peterline, B.M., Luciw, P.A., Barr, P.J., and Walker, M.D. (1986). Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9734-9738.

Puglisi, J.D., Tan, R., Calnan B.J., Frankel, A.D., and Williamson, J.R. (1992). Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* 257, 76-80.

Puglisi, J.D., Chen, L., Frankel, A.D., and Williamson, J.R. (1993). The role of RNA structure in arginine recognition of TAR RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3680-3684.

【O O 8 1】Rice, A.P., and Mathews, M.B. (1988). Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the Tat gene product. *Nature* 332, 551-553.

Rosen, C.A., Sodroski J.G., and Haseltine W.A. (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in human T cell lymphotropic virus type III. *Cell* 41, 813-823.

Rounseville, M.P., and Kumar, A. (1992). Binding of a host cell nuclear protein to the stem region of human immunodeficiency virus type 1 trans-activation-response RNA. *J. Virol.* 66, 1688-1694.

【O O 8 2】Rounseville, M.P., Lin, H.-C., Agbottah E., Shukla, R.R., Rabson, A.B., and Kumar, A. (1996). Inhibition of HIV-1 replication in viral mutants with altered TAR RNA stem structures. *Virol.* 216, 411-417.

Roy, S., Delling, U., Chen, C. H., Rosen, C.A., and Sonenberg, N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4, 1365-1373.

Sheline, C.T., Milocco, L.H., and Jones, K.A. (1991). Two distinct nuclear transcription factors recognize loop and bulge residues of the HIV-1 TAR RNA hairpin. *Genes Dev.* 5, 2508-2520.

【O O 8 3】Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F., and Haseltine, W.A. (1985). Location of the trans-acting region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229, 74-77.

Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E., and Gilboa, E. (1990). Overexpression of TAR sequence renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 63, 601-608.

Tan, R., and Frankel, A.D. (1992). Circular dichroism studies suggest that TAR RNA changes conformation upon specific binding of arginine or guanidine. *Biochemistry* 31, 10288-10294.

【O O 8 4】Tao, J., Chen, L., and Frankel, A.D. (1997). Dissection of the proposed base triple in human immunodeficiency virus TAR RNA indicates the importance of the Hoogsteen interaction. *Biochemistry* 36, 3491-3495.

Tuerk, C., and MacDougall-Waugh, S. (1993). In vitro evolution of functional nucleic acids: high-affinity RNA ligands of HIV-1 proteins. *Gene* 137, 33-39.

Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Zhou, D.-M., Shimotohno, K., Kumar, P.K.R., and Nishikawa, S. (1997). Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur. J. Biochem.* 248, 130-138.

【O O 8 5】Vaishav, Y.N., and Wong-Staal, F. (1991). The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 577-630.

Verhoef, K., Tijms, and Berkhout, B. (1997). Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter. *Cell* 90, 101-110.

ter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res.* 19, 6169-6176.

Weeks, K.M., Ampe, C., Schults, S.C., Steitz, T. A., and Crothers, D.M. (1990). Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind to TAR RNA. *Science* 249, 1281-1285.

【0086】Weeks, K.M., and Crothers, D.M. (1991). RNA recognition by Tat-derived peptides: interaction in the major groove?. *Cell* 66, 577-588.

Wu-Baer, F., Lane, W.S., and Gaynor R.B. (1995a). The cellular factor TRP-185 regulates RNA polymerase II binding to HIV-1 TAR RNA. *EMBO J.* 14, 5995-6009.

Wu-Baer, F., Lane, W.S., and Gaynor, R.B. (1996). Identification of a group of cellular factors that stimulates the binding of RNA polymerase II and TRP-185 to human immunodeficiency virus 1 TAR RNA. *J. Biol. Chem.* 271, 4201-4208.

【0087】Yamada, O., Kraus, G., Luznik, L., Yu, M., and Wong-Staal, F. (1996). Achimeric human immunodeficiency virus type 1 minimal rev responsive element-ribozyme molecule exhibits dual antiviral function and inhibits cell-cell transmission of HIV-1. *J. Virol.* 70, 1596-1601.

Yamamoto, R., Koseki, S., Ohkawa, J., Murakami, K., Nishikawa, S., Taira, K., and Kumar. P.K.R (1997). Inhibition of transcription by the TAR RNA of HIV-1 in a nuclear extract of HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 3445-3450.

Yu, M., Poeschla, E., and Wong-Staal, F. (1994). Progress towards gene therapy for HIV infection. *Gene Ther.* 1, 13-26.

【0088】Yuyama, N., Ohkawa, J., Koguma, T., Shirai, M., and Taira, K. (1994). A multifunctional expression vector for an anti-HIV-1 ribozyme that produces a 5'- and 3'- trimmed trans-acting ribozyme, targeted against HIV-1 RNA, and cis-acting ribozymes that are designed to bind to and thereby sequester trans-activator proteins such as Tat and Rev. *Nucleic Acids Res.* 22, 5060-5067.

Zhou, Q., and Sharp, P.A. (1996). Tat-SF-1: Cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat. *Science* 274, 605-610.

Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48-52.

【図面の簡単な説明】

【図1】in vitro遺伝子選択のスキーム。

【図2】RNAの各クラスの代表的配列および二次構造。

【図3】AはTat由来ペプチド(CQおよびRE)と

TAR RNAまたはミニ11G-31 RNAとの複合体の形成。結合反応液は、5'末端標識化RNA (15,000 cpm) および5、10、20、40、60、80または100 nMのTat由来ペプチドを含んでいた。複合体は、20% 非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動によって未結合RNAから分離した。(A-1) TAR RNAおよびCQペプチド；(A-2) TAR RNAおよびREペプチド；(A-3) ミニ11G-31 RNAおよびCQペプチド；(A-4) ミニ11G-31 RNAおよびREペプチド。Bは、バルジ欠失変異体、すなわちミニ11G-31 RNAにおいてバルジ残基を欠くRNA、とTat由来ペプチド(CQおよびRE)の間の複合体の形成。(B-1) ミニ11G-31 RNAにおいてバルジ残基を欠くRNAおよびCQペプチド；(B-2) ミニ11G-31 RNAにおいてバルジ残基を欠くRNAおよびREペプチド。

【図4】競合結合アッセイの結果。5'末端標識化ミニ11G-31 RNA (20,000cpm)、非標識化ミニ11G-31 RNA (40 nM) および非標識の真のTAR RNAの種々の濃度 (40から8,000 nM) の混合物をREペプチド (80 nM) と30℃で12時間結合させた場合の複合体の形成。上記混合物を、図3の説明文に述べたように、非変性ゲル上で分画した。

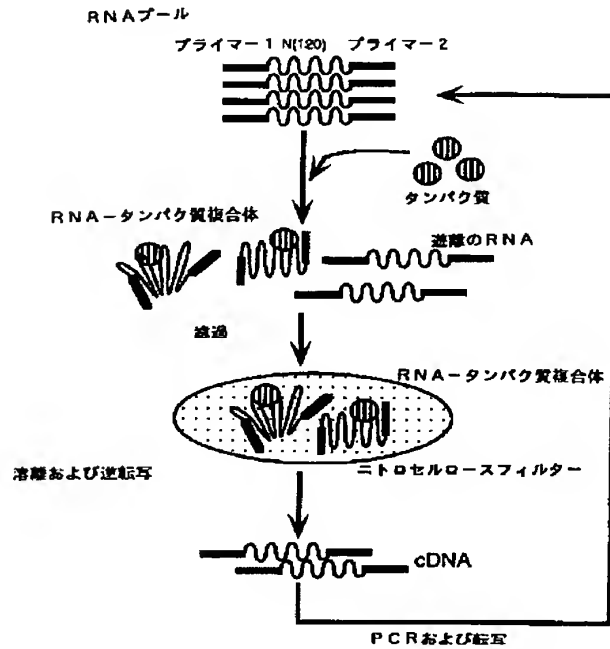
【図5】合成ミニ11G-31 RNA二本鎖。二本鎖のミニ11G-31 RNAから削除された塩基を四角で示す。

【図6】Tat由来ペプチドCQと、二本鎖RNA I (ミニ11G-31)、二本鎖RNA II、二本鎖RNA III、または二本鎖RNA IVとの複合体の形成。反応混合物は、二重鎖1本またはRNA (1個の標識化RNA、通常は5'末端標識化オリゴマーおよび非標識化第2鎖) 単独を含んでいるか、または40 nMのCQペプチドの存在下にあった。複合体は、20% 非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動によって未結合RNAから分離した。3' ΔUC RNAオリゴ単独 (レーン1) またはCQペプチド (40 nM) の存在下 (レーン2)；二本鎖RNA IV単独 (レーン3) またはCQの存在下 (レーン4)；3' RNAオリゴ単独 (レーン5) またはCQの存在下 (レーン6)；二本鎖RNA I II単独 (レーン7) またはCQの存在下 (レーン8)；二本鎖RNA II単独 (レーン9) またはCQの存在下 (レーン10)；二本鎖RNA I単独 (レーン11) またはCQの存在下 (レーン12)。大小の矢じりは、二本鎖RNAとCQペプチドの複合体、および二本鎖RNAをそれぞれ示す。

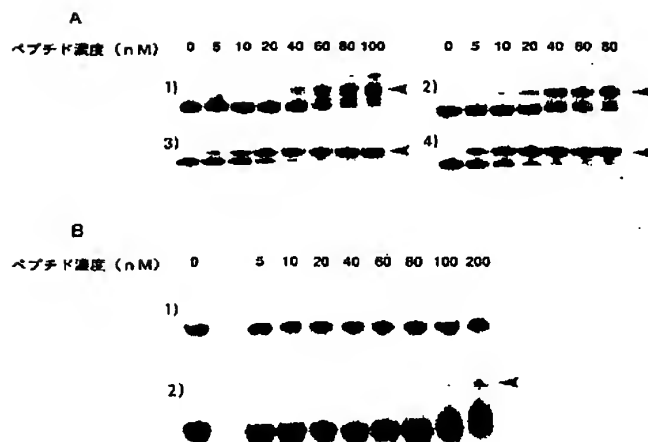
【図7】HeLa細胞核抽出物における、ミニ11G-31および真のTAR RNAによる、CMV初期プロモーターによって駆動される鋳型からの転写の阻害。CMVの初期プロモーターを含む鋳型を、100 pmoleのTAR RNAの不在下 (レーン1) および存在下 (レーン3

および4)、100 pmole の tRNA の存在下 (酵母由来の全 tRNA ; レーン2)、または100 pmole のミニ11G-31の存在下で転写した。一本鎖DNAマーカーをレーンMにのせた。新しく合成された転写物を矢印で\*

【図1】



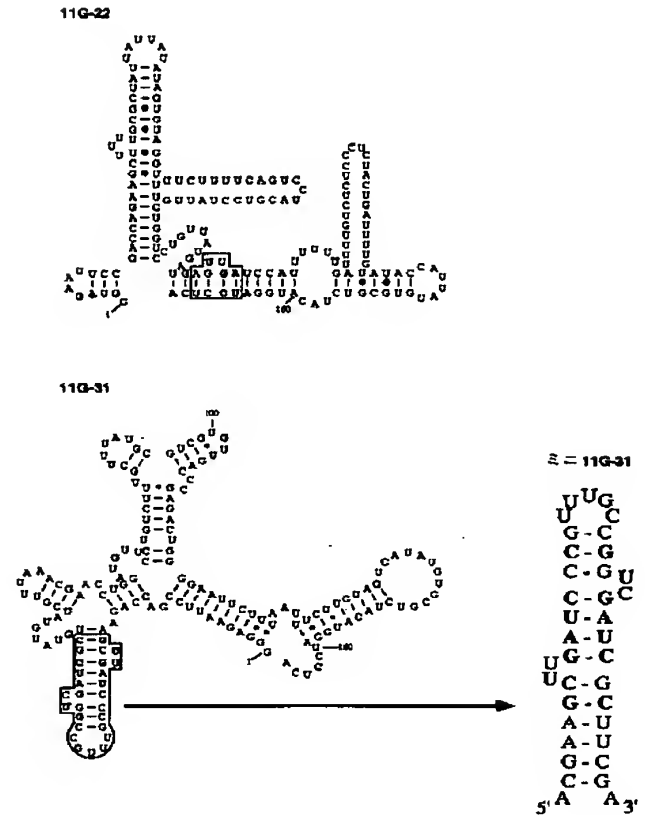
【図3】



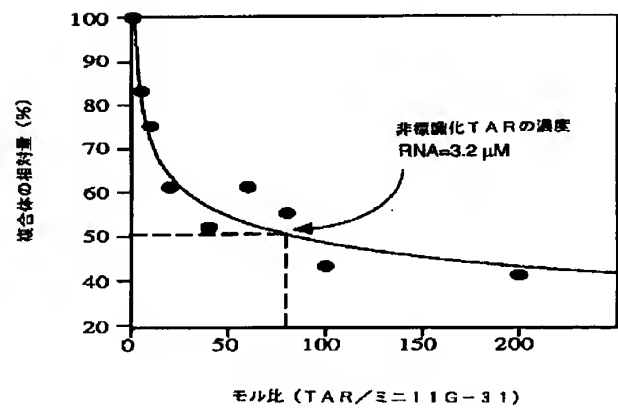
\* 示す。

【図8】 in vitroで合成された転写物 (364 nt)の相対的レベルを、3つの独立した実験で定量した (実験の偏差を誤差バーで示す)。

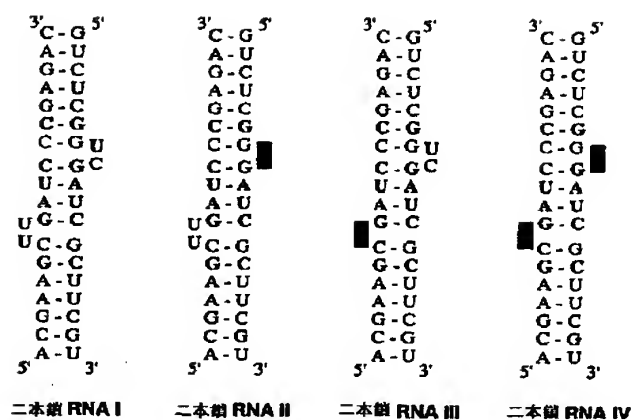
【図2】



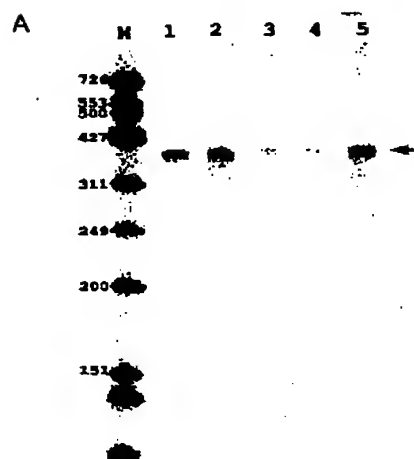
【図4】



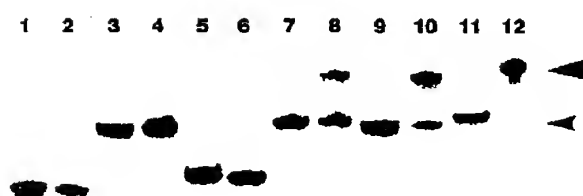
【図5】



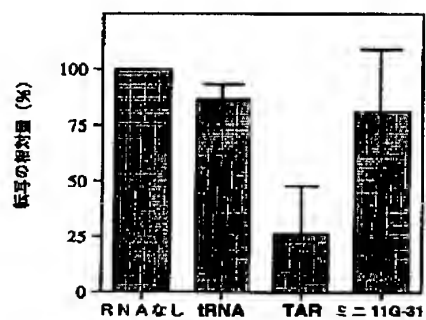
【図7】



【図6】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成9年11月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

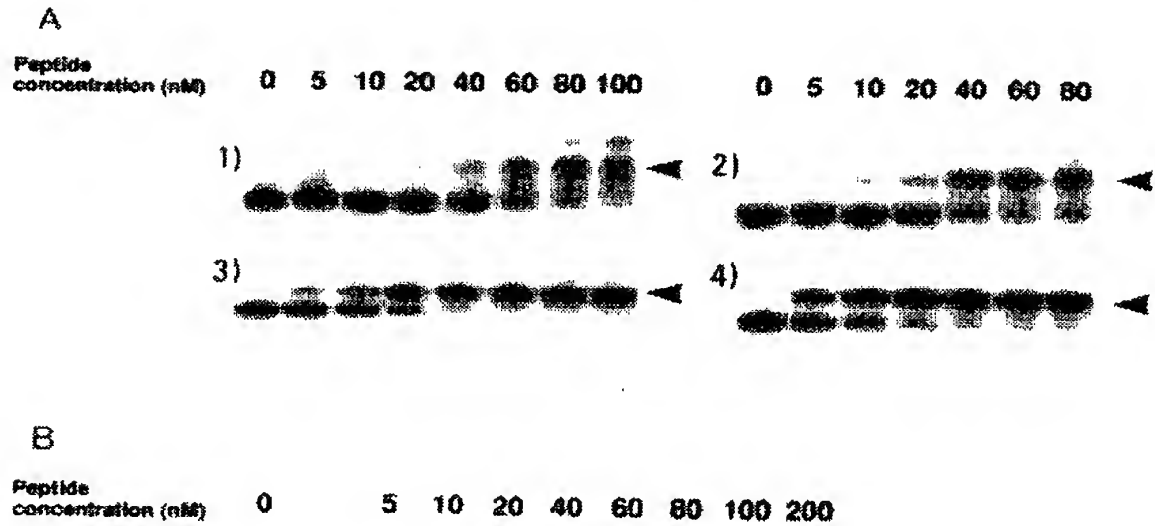
【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

## 図面代用写真



【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

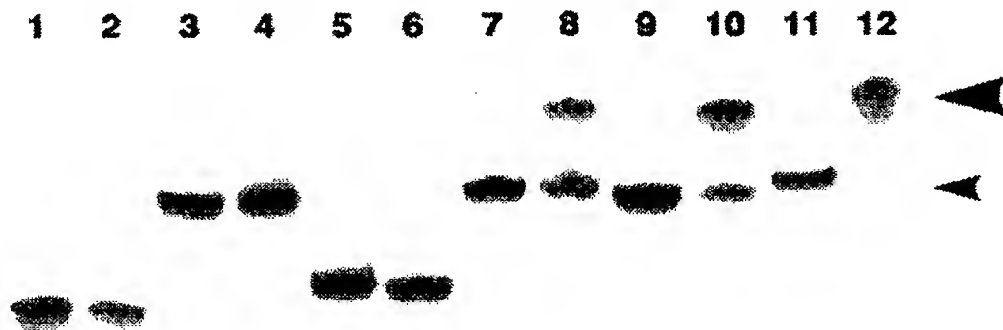
【補正対象項目名】図 6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 6】

## 図面代用写真



【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

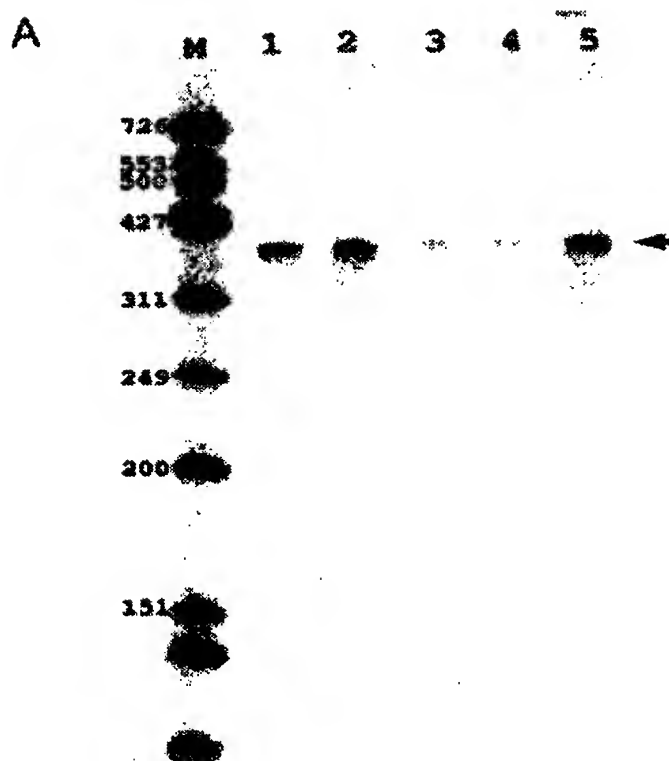
【補正対象項目名】図 7

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 7】

## 図面代用写真



---

フロントページの続き

(72)発明者 多比良 和誠  
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術  
院 生命工学工業技術研究所内



## 【外国語明細書】

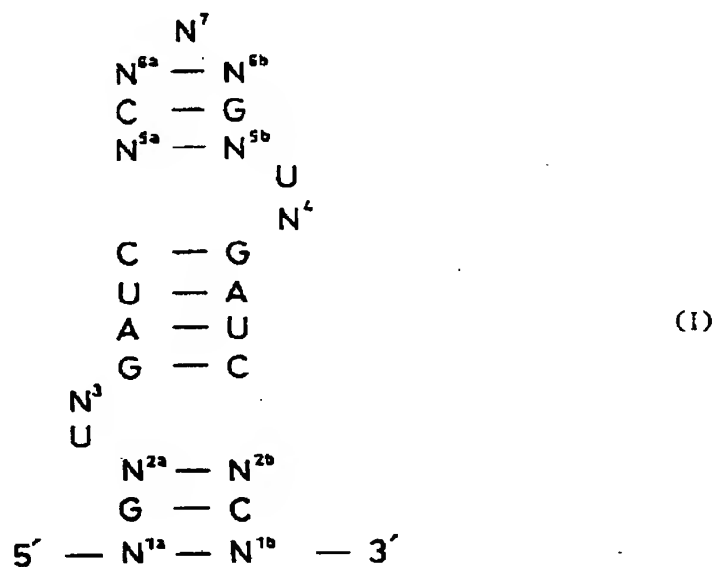
## 1. Title of Invention

RNA having high affinity to Tat protein of HIV

## 2. Claims

(1) A ribonucleic acid that is capable of binding to a trans-activation protein of human immunodeficiency virus and which comprises the nucleotide sequence represented by the following second structure

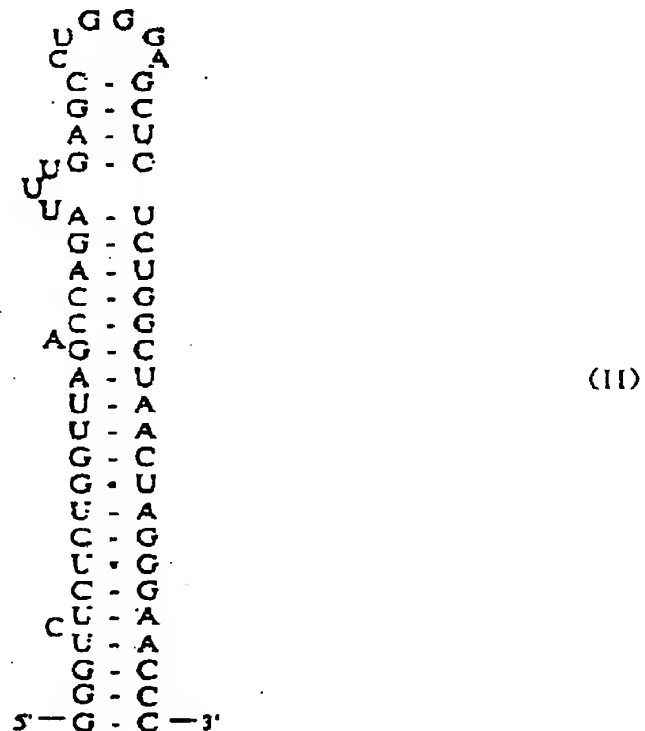
(I):



wherein  $N^{1a}$  and  $N^{1b}$  are at least 2 pairs of nucleic acid bases capable of complementary base pairing,  $N^{2a}$  and  $N^{2b}$  are at least 1 pair of nucleic acid bases capable of complementary base pairing,  $N^3$  and  $N^4$  are each independently 1 or 2 nucleic acid base(s),  $N^{5a}$  and  $N^{5b}$  are at least 1 pair of nucleic acid bases capable of complementary base pairing,  $N^{6a}$  and  $N^{6b}$  are at least 1 pair of nucleic acid bases capable of complementary base pairing,  $N^7$  is 0-5 nucleic acid base(s), when  $N^1$

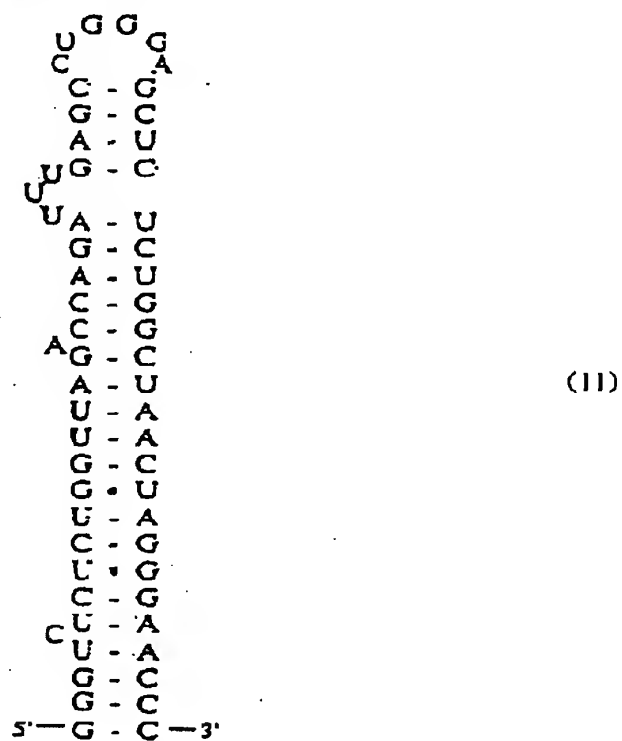
is absent, the ribonucleic acid is duplex and N<sup>a</sup> and N<sup>b</sup> are at least 2 pair of nucleic acid bases capable of complementary base pairing, and the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases.

(2) The ribonucleic acid of claim 1 which is capable of binding to a trans-activation protein of human immunodeficiency virus with higher affinity, compared to a natural occurring trans-activating response region ribonucleic acid consisting of the nucleotide sequence represented by the following second structure (II):



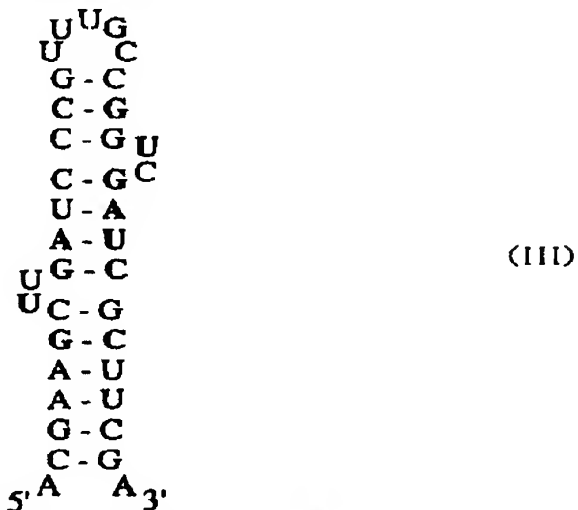
wherein the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases.

(3) The ribonucleic acid of claim 1 or 2 which is capable of binding to a trans-activation protein of human immunodeficiency virus with higher specificity, compared to a natural occurring trans-activating response region ribonucleic acid consisting of the nucleotide sequence represented by the following second structure (II):



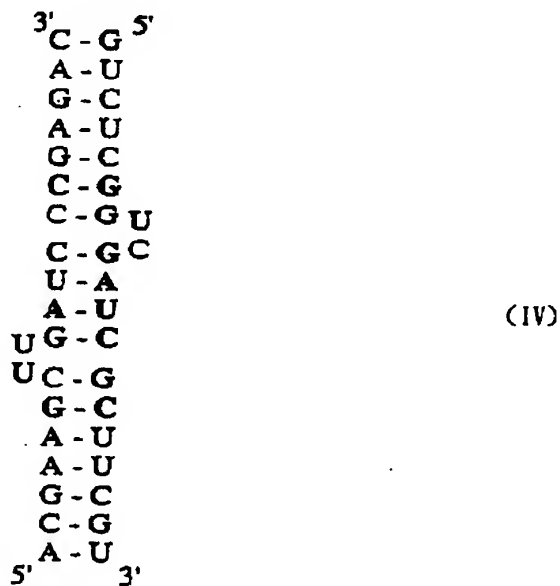
wherein the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases.

(4) The ribonucleic acid of claim 1 which comprises the nucleotide sequence represented by the following second structure (III):



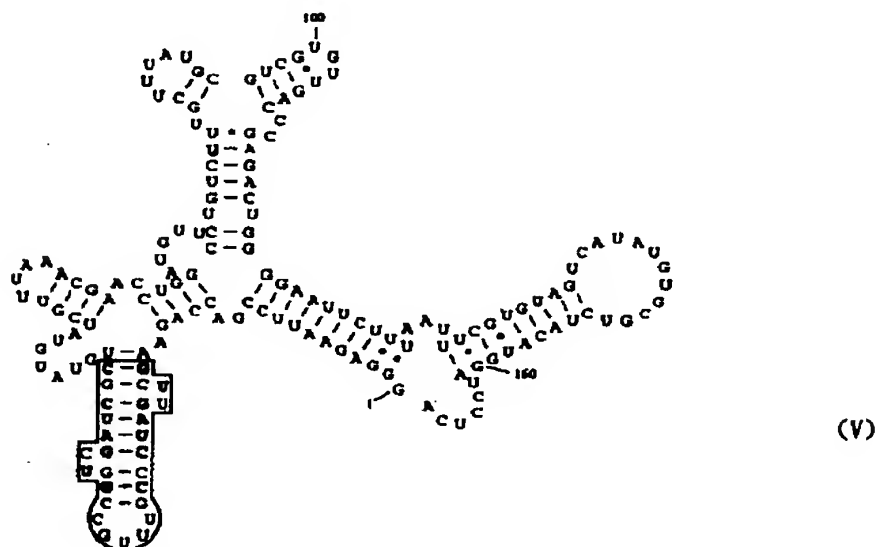
wherein the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases.

(5) The ribonucleic acid of claim 1 which comprises the duplex nucleotide sequence represented by the following second structure (IV):



wherein the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases.

(6) The ribonucleic acid of claim 1 which consists of the nucleotide sequence represented by the following second structure (V):



wherein the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases.

(7) A pharmaceutical composition comprising the ribonucleic acid of claim 1.

(8) The pharmaceutical composition of claim 7 for inhibiting the transcription of human immunodeficiency virus.

(9) The pharmaceutical composition of claim 7 which is used as an anti-virus agent against human immunodeficiency virus.

(10) The pharmaceutical composition of claim 7 for diagnosing a disease associated with human immunodeficiency virus.

(11) The pharmaceutical composition of claim 7 for preventing and/or treating a disease associated with human immunodeficiency virus.

(12) A method for inhibiting the transcription of human immunodeficiency virus by using the ribonucleic acid of claim 1.

(13) The method of claim 12, which comprises introducing the ribonucleic acid of claim 1 into a cell containing human immunodeficiency virus.

### 3. Detailed Explanation of the Invention

#### 〔発明の属する技術分野〕

本発明は、ヒト免疫不全ウイルスのトランス活性化タンパク質に対して高い親和性を持つRNAに関する。

#### 〔従来技術〕

The expression of genes encoded by human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is regulated by the interaction of cellular factors and a viral trans-activator protein, Tat, with specific regulatory elements in the long terminal repeat (LTR) of HIV-1 (Gaynor, 1992). The HIV-1 regulatory protein Tat binds to one of the regulatory elements in the LTR region, which is called the trans-activating response region, TAR, (Rosen et al., 1985; Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986). This region is located immediately downstream from the site of initiation of transcription at the 5' end of all the viral transcripts (Berkhout et al., 1989). It is an RNA element consisting of 59 nucleotides (nt), which is the minimal motif that is sufficient for formation of a stable hairpin structure that allows binding of Tat in vivo (Rosen et al., 1985; Peng and Holland, 1988; Jakobovits et al., 1988). Tat effectively stimulates transcription after its binding to TAR RNA (Cullen, 1988; Peterline et al., 1986; Rice and Mathews, 1988). Deletion studies of TAR RNA revealed that so-called bulge residues are obligatory both for the specific binding to Tat and for trans-activation, whereas loop sequences are necessary for trans-activation but are not essential for the binding of Tat in vivo (Peng and Holland, 1988; Berkhout and Jeang, 1989; Dingwell et al., 1989; Cordingley et al., 1990; Roy et al., 1990; Weeks et al., 1990).

Tat is a small cysteine-rich nuclear protein consisting of 86 amino acids. It has two major domains, a cysteine-rich region and highly basic region (Arya et al., 1985; Sodroski et al., 1985). The

cysteine-rich region is essential for the function of this protein (Garcia et al., 1988; Kubota et al., 1988) and it has a metal-binding domain that probably mediates the metal-linked dimerization of Tat (Frankel et al., 1988). The basic region is responsible for the specific binding to TAR RNA (Weeks et al., 1990), as well as for nuclear localization (Dang and Lee, 1989; Endo et al., 1989). Tat belongs to a family of RNA-binding proteins that contain arginine-rich motifs for recognition of the respective cognate RNAs (Lazinski et al., 1989). A short peptide containing an arginine-rich region binds to TAR RNA with specificity similar to that of the intact protein (Weeks et al., 1990; Cainan et al., 1991a). The tat gene product not only plays a key role in the trans-activation of HIV-1 genes but also has a variety of effects on the growth and metabolism of the host cells (Bnsoli et al., 1990, 1993). Moreover, Tat is now known to be important for the efficient reverse transcription of HIV-1 (Harrish et al., 1997).

Despite several studies on the stimulation by Tat of the trans-activation of expression of the HIV genome, the precise molecular mechanism by which it operates remains obscure. The rates of viral mRNA and protein synthesis induced by Tat in mammalian cells were estimated to be 100-fold higher than control rates (Hauber and Cullen, 1988). It has been reported that Tat functions as an anti-terminator, an elongation factor in transcription and an enhancer of the initiation of transcription (for reviews, see Vaishav and Wong-Staal, 1991; Cullen, 1992; Jeang et al., 1993). Even though the exact function of Tat remains controversial, the emerging consensus appears to be that Tat functions as a promoter-specific elongation factor that modifies the transcription complex upon binding to TAR RNA. Several early studies showed that, for the stimulation of transcription by Tat, both cellular transcription factors and the integrity of the TAR RNA sequences are essential (for



reviews, see Gaynor, 1992; Jones and Peterlin, 1994). However, the order of assembly of components of the transcription complex was not known until recently, it was unknown initially whether Tat binds to the transcription factors first and then binds to the TAR RNA or whether Tat binds initially to the TAR RNA with subsequent binding of transcription factors. Garcia-Martinez et al. (1997) suggested that Tat protein might associate with RNA polymerase II in the preinitiation complex and then the complexed Tat binds to TAR RNA, while stalled RNA polymerase II is passing through the TAR RNA.

A conformational change in TAR RNA upon binding of Tat is among the most intriguing of RNA-protein interactions. The conformational switch was clearly observed by circular dichroism (CD) and NMR studies (Tan and Frankel, 1992; Puglisi et al., 1992; Aboul-ela et al., 1995, 1996). A similar change in conformation of TAR RNA was achieved not only with Tat peptides but also by arginine alone. However, no conformational change was observed either with lysine or with variants of TAR that can no longer bind Tat. Tat-derived peptides and homopolymers of arginine that bind specifically to TAR RNA, as well as a peptide containing a central single arginine residue, were sufficient to reproduce wild-type trans-activation in studies designed to delineate the role of arginine (Cainan et al., 1991a,b). Further NMR studies on the TAR-arginine complex suggested that TAR has a specific binding site for arginine (Puglisi et al., 1992). Arginine appears to induce a structure where in a critical residue, U23, in a triple-base bulge makes a Hoogsteen interaction with an A-U base pair in the adjacent stem. This model was supported by replacing the U-A-U bonding in TAR by the isomorphous C-G-C bonding (Puglisi et al., 1993). Recent modification and mutagenesis experiments also support the model in which a Hoogsteen interaction is critical for the structure of TAR (Tao

et al., 1997). Despite the discrepancy between results of NMR studies of TAR RNA from two different laboratories with respect to the formation of the base triple (as distinct from base pair), the general consensus on the structure of TAR RNA is in agreement about the approximate location of the bulge U in the major groove and the orientation of the functional groups in the TAR RNA.

Since the Tat protein has various functions in the life cycle of HIV-1, as well as in viral proliferation, it is an important and attractive target in efforts to develop weapons against HIV. Several genetic strategies have been tested, in the past, in attempts to repress the proliferation of HIV. Trans-dominant proteins, single-chain antibodies, antisense molecules, ribozymes, decoys (for review, see Yu et al., 1994) and use of the LTR of HIV to produce inducible and toxic gene products have all been tested in cells that were infected by HIV (Harrison et al., 1992). Combinations of these strategies (for example, a ribozyme and a decoy) have also been examined (Yuyama et al., 1994; Yamada et al., 1996). Although the expression and regulation of such therapeutic molecules might be possible in vivo, their constitutive expression could lead to cellular toxicity or to an immune response by the host against the engineered cells. This problem is especially significant in the case of toxins and suicide genes. Among various RNA-based strategies against HIV infection, the decoy strategy has a potential advantage over the use of other RNA inhibitors, such as short antisense RNAs and ribozymes, because the generation of escape mutants might be less frequent: alterations in Tat or Rev (HIV-1 protein) that prevent binding to a decoy would also prevent binding to native elements (such as RRE, the Rev-responsive element, and TAR sequences). Both RRE and TAR RNAs have been exploited as decoys and, in cell cultures, these decoys inhibited the replication of HIV by 80% to 97% (Graham and Maio,

1990; Sullenger et al., 1990; Lisziewicz et al., 1993).

Although decoys might act as much more efficient inhibitors (with possible  $K_i$  values in the sub-nanomolar range) than other molecules, such as antisense RNAs and ribozymes, decoys might potentially be toxic to cells if they were to sequester cellular factors, in particular when the decoy RNA happens to include regions that can interact with cellular proteins. Several previous studies have shown that cellular factors, such as TRP-185 (Wu-Bear et al., 1995), Tat-SF1 (Zhou and Sharp, 1996), polymerase II (Wu-Bear et al., 1995, 1996) and others (Sheline et al., 1991; Rounseville and Kumar, 1992; Gatignol et al., 1991) bind efficiently to TAR RNA. Despite these studies, the effects of TAR RNA on the cellular machinery of the host cells have not been analyzed in detail either in vitro or in vivo. また、これらの天然のTAR RNAよりも、HIV-1 のTat タンパク質に対する親和性および特異性が高いデコイ配列は知られていない。

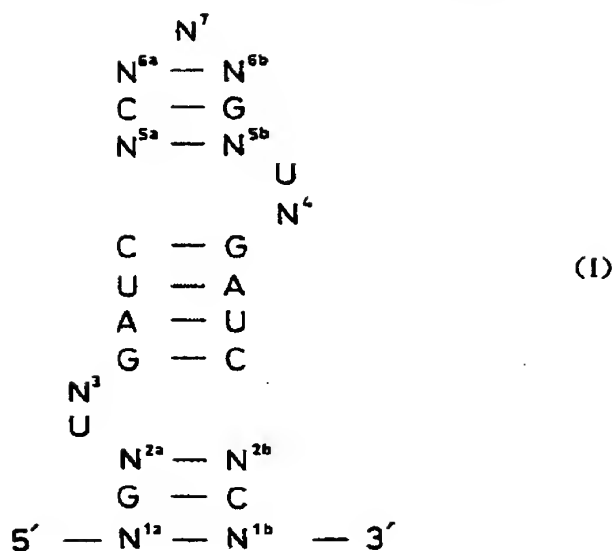
〔発明が解決しようとする課題〕

従って、本発明は、HIVのTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAを提供することを目的とする。

また、本発明は、そのようなRNAの利用方法を提供することも目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

上記の課題を解決するために、本発明者らは、鋭意努力した結果、HIVのTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAを合成することに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、下記の二次構造(I)を持つヌクレオチド配列を含み、HIVのTatタンパク質と結合することができるRNAを提供する。



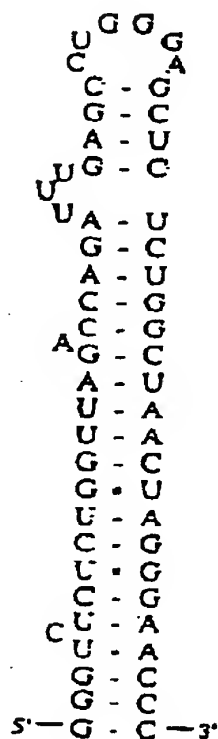
(構造中、N<sup>1a</sup>およびN<sup>1b</sup>は相補的塩基対形成が可能な少なくとも2対の核酸塩基であり、N<sup>2a</sup>およびN<sup>2b</sup>は相補的塩基対形成が可能な1対の核酸塩基であり、N<sup>3</sup>およびN<sup>4</sup>はそれぞれ独立に1または2個の任意の核酸塩基であり、N<sup>5a</sup>およびN<sup>5b</sup>は相補的塩基対形成が可能な1対の核酸塩基であり、N<sup>6a</sup>およびN<sup>6b</sup>は相補的塩基対形成が可能な少なくとも1対の核酸塩基であり、N<sup>7</sup>は1～5個の任意の核酸塩基であるか、あるいは、N<sup>7</sup>は存在しなくともよく、N<sup>7</sup>が存在しないときには、このRNAは二本鎖となり、N<sup>6a</sup>およびN<sup>6b</sup>は相補的塩基対形成が可能な少なくとも2対の核酸塩基であり、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

ここで、「相補的塩基対形成」とは、核酸の塩基がアデニンとウラシル、グアニンとシトシンの間で水素結合により対合することをいう。相補的塩基対形成が可能な核酸塩基対としては、アデニンとウラシル、グアニンとシトシンの組み合わせを挙げることができる。

HIV としては、HIV-1 およびHIV-2 が知られているが、本発明のRNAは特にHIV-1とよく結合する。

本発明のRNAは、下記の二次構造(II)を持つヌクレオチド配列からなる天然の

TAR RNAよりも高い親和性および／または特異性で、HIVのTatタンパク質と結合することができるという。



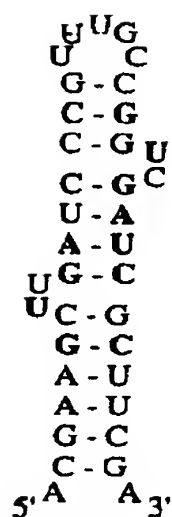
(II)

(配列番号1)

(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

なお、HIVのTatタンパク質との親和性および特異性は、それぞれ、後述のGel-shift competitive binding assay およびTranscription assay で測定することができる。

本発明のRNAの一例として、下記の二次構造(III)を持つヌクレオチド配列を含むRNAを挙げることができる。

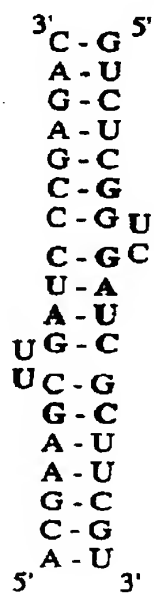


(III)

(配列番号 2)

(構造中、実線は核酸塩基間の水素結合を表す。)

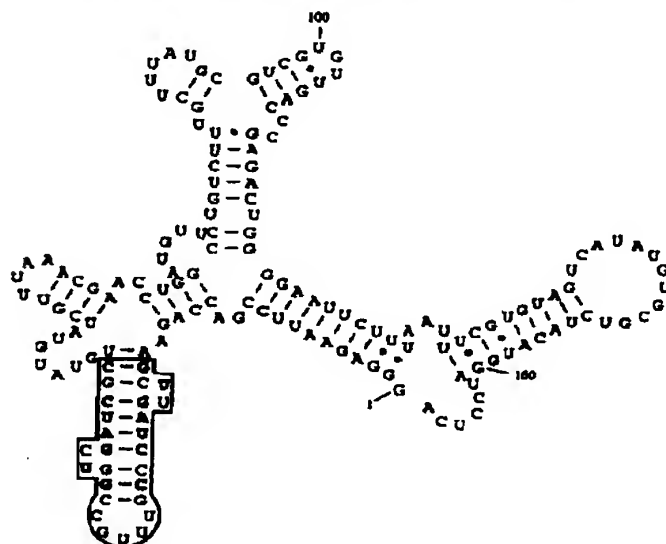
本発明のRNAの別の一例として、下記の二次構造(IV)を持つ二本鎖のヌクレオチド配列を含むRNAを挙げることができる。



(IV)

(配列番号 3)

本発明のRNAのまた別の一例として、下記の二次構造(V)を持つヌクレオチド配列からなる請求項1記載のRNAを挙げることができる。



(V)  
(配列番号 4)

また、本発明は、上記のRNAを含む医薬組成物を提供する。この医薬組成物により、ヒト免疫不全ウイルスの転写を阻害することができる。従って、この医薬組成物をヒト免疫不全ウイルスに対する抗ウイルス剤として用い、ヒト免疫不全ウイルスが関与する疾病を予防および／または治療することができる。また、本発明の医薬組成物を用いてヒト免疫不全ウイルスが関与する疾病を診断することもできる。さらにまた、本発明は、上記のRNAを用いて、ヒト免疫不全ウイルスの転写を阻害する方法を提供する。この方法を実施するにあたっては、ヒト免疫不全ウイルスを含む細胞に上記のRNAを導入すればよい。

本発明のRNAは、上記の二次構造(1)を持つヌクレオチド配列を含む。このよ

うなRNAは、図1に概略を示した以下の方法で作製することができる。

プライマー1とプライマー2の結合部位にはさまれ、かつ120ヌクレオチドの長さのランダムな配列を持つRNAプールとTatタンパク質を試験管内で混合する。これをニトロセルロース膜で濾過し、膜上に残ったTatタンパク質とRNAの複合体を回収する。複合体からRNAを溶離後、逆転写反応によりcDNAを合成する。さらにPCRでcDNAを増幅し、続いて試験管内転写反応によりRNAを作る。以上の操作を5～10回繰り返すことで、Tatタンパク質に特異的に強く結合するRNAのみを得ることができる。

上記のようにして得られたRNAとHIV(例えば、HIV-1)のTatタンパク質との結合活性は、以下のようにして測定することができる。

$^{32}\text{P}$ 標識したRNAとTatタンパク質を1対1の割合で試験管内で混ぜた後、ニトロセルロース膜で濾過後、膜をよく洗浄後、膜上に残った $^{32}\text{P}$ 量を測定する。残存RNA量/使用RNA量(%)を結合活性(%)とする。

本発明のRNAは、上記の二次構造(II)を持つヌクレオチド配列からなる天然のTAR RNAよりも、HIV(例えば、HIV-1)のTatタンパク質に対する高い結合親和性を有するが、HIV-1のTatタンパク質に対する結合親和性は、以下のようにして測定することができる。

$^{32}\text{P}$ 標識したRNA(III)(又はRNA(IV))と標識していない天然TAR RNA(II)を1対1で混ぜる。そこへ、RNA(III)(又はRNA(IV))とTAR RNAの濃度比1:1から1:200までの種々の混液を加える。

更にTatタンパク質の結合領域に相当するペプチド(RE)を一定量加え、30℃12時間保温後ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、RNAとRNAペプチド複合体を分離し、複合体の割合を出す。

タテ軸にこの複合体の割合をヨコ軸にTAR RNA/RNA(III)の比率をとったグラフを描き、50%複合体を形成する時の比率から特異性を算出する。

さらに、本発明のRNAは、上記の二次構造(II)を持つヌクレオチド配列からなる天然のTAR RNAよりも、HIV(例えば、HIV-1)のTatタンパク質に対する特異性が高いが、HIV-1のTatタンパク質に対する特異性は、以下のようにして測定することができる。



HeLa細胞核抽出物中で、サイトメガロウイルス(CMV)DNAを鋳型にCMVプロモーターからの転写を行う(364ヌクレオチド)。この時同時に、TAR RNA又はRNA(III)(又はRNA(IV))を添加し、転写産物の量を比較する。

本発明のRNAはHIV(例えば、HIV-1)の転写阻害活性を有するが、HIV-1の転写阻害活性は以下のようにして測定することができる。

HIV-1 LTRをゲノム中に組み込んだHeLa細胞に、プロモーター下流に本RNA遺伝子を持つプラスミド1とTatタンパク質を発現するプラスミド2を同時にトランスフェクトし、LTRの下流に組み込んであるルシフェーゼの発現量を測定することにより、転写阻害活性を測定する。

HIVを含む細胞に本発明のRNAを導入することにより、該細胞中のHIVの転写を阻害することができる。例えば、本発明のRNAをリボソームに封入し、これを生体に投与して、HIVを含む細胞内に取り込ませることにより、HIVの転写を阻害することができる。このような方法については、“Lipidic vector systems for gene transfer”(1997) R. J. Lee and L. Huang Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst 14, 173-206.に記載されている。また、本発明のRNAをコードするDNAをウイルスなどのベクターに組み込んで、HIVを含む細胞内に導入し、該細胞内でこのベクターを発現させ、本発明のRNAを産生させることにより、HIVの転写を阻害することもできる。このような方法については、“Viral vectors in gene therapy”(1997) A. E. Smith Annu. Rev. Microbiol 49, 807-838.に記載されている。これらの方法の詳細およびこれらの方法に用いられる材料は、遺伝子治療の分野で知られており、それらを本発明においても用いることができる。

HIVの転写を阻害することにより、HIVが関与する疾病を予防および/または治療することができる。HIVが関与する疾病としては、後天性免疫不全症候群(AIDS)を挙げることができる。投与は、疾病の状態の重篤度や生体の応答性によるが、治療の有効性が認められるまで、あるいは疾病状態の軽減が達成されるまでの期間にわたり、適当な用量、投与方法、頻度で行えばよい。

また、本発明のRNAを用いて、HIVが関与する疾病を診断することができる。本発明のRNAを抗体の代わりに利用することができる。本発明のRNAを蛍光などで標識しておき、HIVに感染している細胞の抽出液又は細胞をつぶした物と混ぜ、ニ

トロセロース膜で濾過する。HIV由来のTatタンパク質が細胞内に存在すれば、膜上にトラップされ、検出できる。

〔実施例〕

本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

〔実施例 1〕

Isolation of an RNA aptamer with high affinity for Tat protein (図 1)  
TAR RNA of HIV-1 binds to several cellular factors in the cell. In view of its inhibitory effects on the transcription of unrelated genes, as observed above, authentic TAR RNA might not be the most suitable antagonist and specific inhibitor of Tat. In order to isolate an RNA motif that binds to Tat specifically and with high affinity, we exploited a strategy for genetic selection in vitro using a pool of RNAs with a large random core sequence of 120 nt (120 N).

In the first selection cycle, about  $10^{14}$  RNA sequences were allowed to bind to the HIV-1 Tat protein at a molar ratio of protein to RNA of 1:10 in the binding buffer. In subsequent cycles, molar ratios of Tat and RNAs [the 120 N pool, specific competitors (either TAR RNA or selected pool RNA with a random core region of 12-18 nt having about 5% binding ability to Tat) and a non-specific competitor, tRNA] were manipulated in order to increase the stringency of selection (Table 1). After each set of two cycles of selection, the RNA pool was analyzed in a filter-binding assay for binding to Tat. As the cycles progressed, levels of specific RNA aptamers that bound to Tat increased in the pool from 1% to 9%. Since the  $10^{14}$  variants in the 120 N pool could not encompass the entire range of possibilities ( $10^{72}$ ) variants, mutagenic PCR was introduced after the ninth cycle to increase the diversity of functional molecules. However, with the introduction of mutagenic PCR, the number of binding species was reduced in the

pool, probably as a number of the mutation of critical residues and, therefore, we cloned products from both the ninth and the eleventh cycle for the analysis of sequences.

In all, we sequenced 37 clones from the ninth and the eleventh cycles and divided the sequences from the eleventh cycle into four classes. Two major classes of sequences (two representative sequences, 11G-22 and 11G-31, are shown in Fig. 2) were derived from the eleventh cycle RNA pool, as compared to the ninth cycle, in which many sequences were unrelated. When these RNA sequences were folded by the Mfold program (Zuker, 1989), 15 clones, representing about 40% of the population in the pool had a TAR-like motif (containing all core elements) in their randomized region. However, some of the clones has two TAR-like motifs, for example, 11G-31 (Fig. 2). Combinatorial analysis of TAR core elements predicts that at least one sequence should be found in every  $2.16 \times 10^4$  nucleotides (Ferbeyre et al., 1997). Despite such a low probability of distribution of TAR core elements, we were able to isolate TAR-like elements from the random pool, and even a double-TAR element, probably because selective pressure was maintained during the entire selection procedure. Although the predominant selected aptamers that belonged to the two major classes contained two bulge residues (UC or UU), as opposed to three in the TAR of HIV-1, mutational analysis has revealed that at least two bulge residues are necessary for recognition of Tat (Weeks and Crothers, 1991). Moreover, TAR RNA of HIV-2 also contains two (UU or UA in two TAR motifs) bulge residues that allow efficient binding to the HIV-1 Tat peptide (Chang and Jeang, 1992). A similar selection procedure, using an RNA pool with a 30 nt random core, resulted in isolation of other structural forms (Tuerk and MacDougall-Waugh, 1993). In this case, selection might have been hampered by the short random-core region over the fixed sequences

(for amplifications).

Table 1.

Table 1. Concentrations of RNA and protein used and the ability of the RNA pool to bind to Tat after each selection cycle.

Cycle number	Concentration of				Binding ability <sup>a</sup>	
	Tat	pool RNA	tRNA	RNA <sup>#</sup>	NP	P
	$\mu\text{M}$				%	
1	0.50	5.0	-	-	0	2
2	0.50	1.5	3	1	0	4
3	0.50	1.5	5	5	0	5
4	0.50	3.0	10	10	0	4
5	0.50	1.5	40	7	0	6
6	0.50	5.0	50	10	0	5
7	0.50	3.0	50	7	0	6
8	0.50	5.0	50	14	0	7
9	0.50	5.0	50	14	0	9
10	0.33	5.0	50	14	0	7
11	0.17	2.5	25	7	0	9

a. The binding assays were performed either in the presence (P) or absence (NP) of Tat protein. Both Tat and individually labeled RNA pools from different cycles were incubated together and then filtered under similar conditions to those used during selection *in vitro* in the presence of a 10-fold excess a non-specific competitor (tRNA) in 100- $\mu\text{l}$  binding buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl]. # Specific RNA competitor (see Experimental Procedures)

## 〔実施例 2〕

## Mini 11G-31 RNA binds efficiently to Tat-derived peptides

Since a short peptide that contains an arginine-rich region binds to TAR RNA with specificity similar to that of the intact protein (Weeks et al., 1990; Calnan et al., 1991a), we used both the CQ (amino acids 37-72) and RE (amino acids 49-86) peptides in further studies. These peptides were synthesized chemically and purified to homogeneity (>95% purity) by reverse-phase HPLC.

Initially, a representative clone from each class was subjected to a competitive binding assay in the presence of a Tat-derived peptide (CQ or RE; see Experimental Procedures) and authentic TAR RNA. Only RNA motifs with two TAR-like motifs, such as 11G-31 RNA, appeared to compete with TAR for bind to the Tat peptides (data not shown). In order to locate the binding region in the 11G-31 RNA (one of the RNAs with high affinity for the Tat peptides), we chemically synthesized a minimal RNA (mini 11G-31; 37 mer) that had two TAR-like motifs and analyzed its binding to Tat peptides on native gels. Both CQ and RE peptides efficiently bound to mini 11G-31 RNA (Fig. 3, A and B).

To compare the binding affinities of the aptamer, mini 11G-31, and TAR RNA to the CQ and RE peptides, we performed binding assay in which labeled RNAs were incubated with various concentrations of CQ or RE peptide, with subsequent separation of complexed and free RNA on a 20% non-denaturing polyacrylamide gel (Fig. 3A). The amount of each complex formed was calculated directly from the intensities of bands on the gel. Authentic TAR RNA formed a complex at a level of about 50% in the presence of 56 nM CQ peptide (Fig. 3A-1), whereas mini 11G-31 RNA efficiently formed the same amount of complex even at 14 nM CQ peptide (Fig. 3A-3). When we performed a similar analysis using RE peptide, authentic TAR RNA formed a complex at a level of about 50% in

the presence of 23 nM RE peptide (Fig. 3A-2), whereas mini 11G-31 RNA formed the same amount of complex even at 3 nM RE peptide (Fig. 3A-4). These results suggest that the selected aptamer had higher affinity for the Tat peptides.

In order to evaluate the importance of bulge residues, we synthesized an RNA that lacked the bulge residues in mini 11G-31 RNA and analyzed its binding in gel-shift assays with the CQ and RE peptides. No complex was formed even at a high concentration (200 nM) of CQ peptide (Fig. 3B-1). However, a small amount of complex was formed at high concentrations (>80 nM) of the RE peptide (Fig. 3B-2). A similar experiment was performed with authentic TAR RNA, as well as with the bulge mutant RNA, to examine binding to the RE and CQ peptides and we observed that the CQ peptide efficiently distinguished the bulge variant, as compared to the RE peptide, a result consistent with previous observations (Churcher et al., 1993). From these studies it appears that the bulge residues in mini 11G-31 are important for the recognition of Tat peptides.

Our various studies indicated that core elements of TAR RNA were well conserved in the isolated aptamers that belonged to the two predominant classes, suggesting the importance of the conserved residues. The sequences of the selected RNAs, sequences containing either a single or a double TAR motif, confirm the details of all the core elements that were previously identified as being required for binding of authentic TAR RNA to Tat. Deletion of bulge residues from mini 11G-31 RNA completely abolished the binding of Tat peptides. In addition, the bulge U residue was found in the single and the double TAR motif. This motif probably forms a Hoogsteen base pair with A-U (Watson-Crick paired) residues to form a base-triple U•A•U as proposed for complexes of arginine or the Tat peptide and TAR RNA. Taken

together, the recent mutational results of Tao et al. (1997) and our present results suggest that the arginine-binding motif of TAR can be summarized as 5' UXnGA, where the U residue is predicted to make a Hoogsteen interaction with the A residue, Xn indicates at least one unpaired nucleotide and the G residue forms a pocket for binding of arginine.

### 〔実施例 3〕

Comparison of the relative affinities of TAR and mini 11G-31 for the Tat peptide

When authentic TAR RNA and mini 11G-31 RNA were titrated with various amounts of Tat peptides, the aptamer was observed to bind efficiently to the Tat peptides. We next performed competitive binding assays to compare the affinities of authentic TAR RNA and mini 11G-31 RNA directly. The labeled aptamer and TAR RNA were incubated at a ratio of 1 : 1 with unlabeled aptamer and TAR RNA at various molar ratios (ranging from 40-8,000 nM) in the presence of 80 nM RE peptide. The reaction mixture was allowed to equilibrate at 30°C for 12 hr and resolved on a 20% non-denaturing polyacrylamide gel. The amount of complex formed by the aptamer with the RE peptide was calculated for various ratios and we found that the amount of the aptamer-peptide complex fell by 50% when the molar ratio was one to eighty (mini 11G-31 : TAR = 40 nM : 3,200 nM). These results suggested that the affinity for the RE peptide of the aptamer might be about 80 times higher affinity ( $DI/2 \approx 3.2 \mu M$ ) than that of authentic TAR RNA (Fig. 4). By contrast, no TAR-peptide complex was detected when the molar ratio of non-labeled aptamer to non-labeled TAR RNA was 1 : 1. In earlier studies, peptides derived from the arginine-rich region of HIV-1 appeared to bind to authentic TAR RNA at concentrations between 16 pM to 40 nM (Churcher et

al., 1993; Long and Crothers, 1995). Both results of titration of Tat peptide and of the competitive binding assays suggest that the isolated aptamer not only interfered with Tat/TAR interactions but also efficiently trapped Tat peptides at sub-nanomolar concentrations. This property is clearly desirable for an efficient decoy of viral proteins.

#### 〔実施例4〕

The double TAR-like RNA motif has enhanced affinity for the Tat peptide.

In order to define clearly the importance of the double TAR-like motif in the efficient binding to Tat peptides, we separated the two strands and deleted the loop sequences (Fig. 5). Duplex RNA I, that could mimic mini 11G-31 RNA, was prepared by annealing two chemically synthesized 5' and 3' RNA oligomers, (20 mers). Duplex RNA II (with a deletion of the 3'-bulge residues U and C) was prepared by annealing 3'  $\Delta$ UC and the 5' RNA oligomers. Duplex RNA III (with a deletion of the 5'-bulge residues UU) was prepared by annealing the 3' and 5'  $\Delta$ UU oligomers. To prepare duplex RNA IV (with deletion of both pairs of bulge residues) both 3'  $\Delta$ UC and 5'  $\Delta$ UU oligomers were annealed. After labeling of the 5'-end of the oligomer in each duplex, we equilibrated the CQ peptide (40 nM) with each duplex in binding buffer for 30 °C for 1 h. The products were resolved on a non-denaturing polyacrylamide gel (Fig. 6) and the amount of each complex was calculated as mentioned above. The duplex structure that contained both bulges (duplex RNA I) formed a complex at a level of about 80% at 40 nM (Fig. 6, lane 12) and mini 11G-31 RNA formed a similar amount of complex. Deletion of either the 3'-end bulge residues UU (in duplex RNA II); (Fig. 6, lane 8) or the 5'-end bulge residues UC (duplex RNA III); (Fig. 6, lane 10) reduced by about 50% the amount of complex formed with the CQ peptide. After deletion of both pairs of



bulge residues in the duplex (duplex RNA IV) no complex was formed in the presence of the CQ peptide (Fig. 6, lane 4). The results obtained suggest that the ratio of aptamer to peptide in the complex was one to one and that both pairs of bulge residues did indeed play important roles in the efficient binding to the CQ peptide.

#### 〔実施例 5〕

The effects of mini 11G-31 RNA in a cell-free transcription assay  
In order to examine the effect of the isolated aptamer (mini 11G-31) on transcription of unrelated templates, we performed transcription assays in extracts of HeLa cell nuclei (Fig. 7). Addition of exogenous authentic TAR RNA (100 pmole) inhibited the transcription of the CMV-derived template by about 50-60% (Fig. 7, lanes 3 and 4) (Yamamoto et al, 1997). Transcription from the CMV promoter in the absence (Fig. 7, lane 1) or in the presence of 100 pmole of tRNA (total tRNA from yeast); (Fig. 7, lane 2), and in the presence of 100 pmole of mini 11G-31 RNA (Fig. 7, lane 5) was unaffected or only marginally affected. Quantification of the results of three independent transcription experiments revealed that only TAR RNA inhibited transcription to a significant extent (Fig. 8). Thus, the isolated aptamer bound to Tat peptides with high affinity as compared to authentic TAR RNA and it had no negative effect on the transcription of unrelated genes, as judged from the results of transcription in vitro. Therefore, it seems that mini 11G-31 RNA might be very useful as a Tat-specific decoy.

#### Conclusion

Using a strategy of genetic selection in vitro, we isolated an RNA aptamer, 11G-31, with high affinity to the Tat protein of HIV-1. Both

full-length 11G-31 RNA and mini 11G-31 appeared to bind to the Tat peptides with a similar efficiency. The isolated aptamer had two TAR-like RNA motifs opposite one another which were found to assist in the high-affinity binding of the aptamer to Tat peptides. The absence of inhibitory effects on transcription by the aptamer, as compared to the inhibition by authentic TAR RNA, makes the mini 11G-31 RNA an attractive molecule for further analysis as a potential Tat decoy in infections by HIV-1.

上記の実施例において行った種々の実験の手順を以下に示す。

[Preparation of TAR and mutant TAR RNAs]

Oligodeoxyribonucleotide templates containing the T7 promoter and sequences that corresponded to the RNAs shown in Figure 1 were synthesized with a DNA synthesizer (model 392A; Applied Biosystems, USA). In the presence of the reverse primer 5'-GGGTTCCCTAGTTAGCCAGA-3' (配列番号 5), single-stranded DNA oligonucleotides were converted to double-stranded DNA by Taq DNA polymerase (Nippon Gene, Japan). Each reaction was carried out in a 100- $\mu$ l mixture that contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM dNTPs, 100 pmole of reverse primer, 78 pmole of DNA oligonucleotide and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Takara, Japan). The reaction mixture was subjected to cycles of 94°C for 1 min, 45°C for 1 min and 68°C for 2 min, until a product of the desired size was obtained. The resulting dsDNA template was precipitated in ethanol and transcribed by T7 RNA polymerase to generate TAR RNA or a mutant TAR RNA. Transcription in vitro was completed during incubations at 37°C for 2 hours using a T7 Ampliscribe kit (Epicentre Technologies, USA). After the synthesis of RNAs and treatment with DNase I, reaction mixtures were fractionated by electrophoresis on a 10% denaturing polyacrylamide gel (PAGE). RNAs were

extracted and recovered from the gel after ethanol precipitation.

[Transcription assays in vitro in the presence of TAR RNA and mini 11G-31 RNA]

In order to investigate the effects of TAR RNA on the cellular machinery at the transcriptional level, we used the cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter that either contained or lacked enhancer elements. We chose CMV DNA as the template, as an example, for evaluation of the effect of TAR RNA on the LTR-independent transcription of a template. The CMV early-promoter region (from nt -238 to 364) was amplified by Taq DNA polymerase with specific primers [5'-TTAGTCATCGCTATTACCATGG-3' (配列番号 6) and 5'-AGGCCT GGATTCACAGGACGGGTG-3' (配列番号 7)] by PCR [94°C for 3 min, 50°C for 1.15 min, and 72°C for 3 min; 30 cycles]. The resulting product of PCR (602 nt) was recovered by ethanol precipitation and used in the transcription assay. The transcription reaction was carried out with an extract of HeLa cell nuclei (Promega, USA) in the presence of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP. Initially, 13 units of the nuclear extract, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM each ATP, GTP and UTP and 16  $\mu$ M CTP plus 10  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP (3,000 Ci/mmol; Amersham, U.K.) were combined in buffer [20 mM HEPES (pH 7.9), 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 20% glycerol], mixed with 100 pmole of TAR RNA, of mini 11G-31 RNA or of total tRNA from yeast (Boehringer Mannheim, Germany) and allowed to equilibrate for 15 min at 30°C. This reaction mixture was supplemented with 100 ng of template DNA for PCR to give a final reaction volume of 25  $\mu$ l and incubation was continued at 30°C for a further 45 min. The reaction was terminated by addition of 175  $\mu$ l of stop solution [0.3 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.3 M sodium acetate, 0.5% SDS, 2 mM EDTA and 3 mg/ml of tRNA] and the products were extracted once with phenol and chloroform before precipitation in ethanol. The newly

synthesized RNAs were denatured in loading buffer (25 mM EDTA and 4.5 M urea) at 90°C for 5 min, loaded on a 6% polyacrylamide gel that contained 7 M urea and fractionated by electrophoresis. Bands on the gel were quantitated with an image analyzer (BAS 2000; Fuji Film, Japan)

[Synthesis of Tat-derived peptides and gel-shift assays]

Two Tat-derived peptides that spanned the arginine-rich region of Tat protein were synthesized chemically: CQ (amino acids 37-72, CPTTKALGISYGR KKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQ(配列番号 8), 36 mer); and RE (amino acids 49-86, RKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE(配列番号 9), 38 mer). These peptides were purified by HPLC and their compositions were confirmed, after hydrolysis, by reverse-phase HPLC.

CQ peptide was titrated against 5'-labeled TAR or a variant in an 8- $\mu$ l binding reaction [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 70 mM NaCl, 2 mM EDTA, 40 nM total tRNA from yeast (Boehringer) and 0.01% Nonidet P-40 (Shell Chemicals, USA)]. Initially, each labeled TAR RNA was denatured at 94°C for 2 min and allowed to equilibrate at room temperature for 10 min before mixing with various concentrations of the peptide. The mixtures were incubated at 30°C for 1 h and the complex and free RNAs were separated by PAGE on a 15% non-denaturing gel. The amount of each complex on the gel was quantitated with the image analyzer.

[Tat protein and the RNA pool]

The Tat protein of HIV-1 that we used for selections was purchased from RepliGen (USA). Initially this Tat protein was tested for LTR-dependent trans-activation in a cell-free transcription assay with a HeLa nuclear extract and it was demonstrated that the preparation efficiently

supported trans-activation. The preparation was also analyzed for efficient binding to TAR. From its properties, we reasoned that the preparation contained active Tat protein of high purity (>90%).

The RNAs in the pool contained 120 nt (N) random core region that was flanked by two constant regions for amplification, as follows (Ellington and Szostak (1992)): 5'--GGGAGAAUCCGACCAGAAGCUU--120N--CAUAUG UGCG UCUACAUGGAUCCUCA--3' (配列番号 1 0). The primers used for amplification of the pool were 5'-ACTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCCGACCAGAAG-3' (designated 39.169, 配列番号 1 1) and 5'-TGAGGATCCATGTAGACGCACATA-3' (designated 24.169, 配列番号 1 2). In the selection cycles, yeast tRNA (Boehringer Mannheim) was used as a non-specific competitor.

[Selection in vitro]

The protocol that we followed for selection in vitro resembled that reported by Urvil et al. (1997). The first cycle of selection was carried out in binding buffer that contained 5.0  $\mu$ M (final concentration) RNA (representing approximately  $4 \times 10^{13}$  RNA sequences) and 0.5  $\mu$ M Tat protein (HIV-1). Before mixing of Tat protein and pool RNAs, initially, the RNAs in the pool were denatured in binding buffer at 90°C for 2 min and allowed to cool at room temperature for 10 min to facilitate the equilibration of different conformers. The reaction mixture was incubated for 1 h and filtered as described elsewhere (Urvil et al., 1997). After each of the next five cycles, concentrations of pool RNAs were manipulated and RNAs were allowed to compete for binding to Tat in the presence of increasing concentrations of both non-specific RNA (E. coli tRNA) and specific competitor RNA (TAR RNA containing nts +18 through +44) up to the sixth cycle. From the seventh to the eleventh cycle, the pool RNAs were allowed to compete additionally with another specific pool of competitor RNAs [a selected pool (12-18 N pool, with

Tat-binding ability of about 5%]. For the last two cycles, the concentration of Tat protein was reduced significantly. The binding buffer consisted of 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) and 50 mM KCl. Pool 0 RNA was pre-filtered through a prewetted nitrocellulose acetate filter (HAWP filter, 0.45  $\mu$ m, 13.0 mm diameter; Millipore, USA) in a "Pop-top" filter holder (Nucleopore, USA) to select against RNAs that bound selectively to the filter. This pre-filtering was performed after each additional cycle. The Tat-RNA complexes were collected on a filter after each cycle of selection by washing with 1 ml of binding buffer. Bound RNAs were eluted from filters with 0.4 M sodium acetate, 5 mM EDTA and 7 M urea (pH 5.5) at 90°C over the course of 5 min. After ethanol precipitation, reverse transcription and amplification by PCR were performed with AMV reverse transcriptase (Seikagaku, Japan) and Taq DNA polymerase (Nippon Gene), respectively, as described elsewhere (Urvil et al., 1997).

In addition, a mutagenic PCR protocol (Leung et al., 1989) was also employed during the ninth, tenth and eleventh cycles. In these cycles, half of the cDNA reaction mixture was amplified as described above, while the remaining half was amplified in 100  $\mu$ l of a reaction mixture for PCR that contained 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6.1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6.7 mM EDTA (pH 8.0), 0.17 ng/ml BSA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% DMSO, 0.2 mM dATP, 1 mM each of dCTP, dGTP and dTTP, 0.5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 5 U of Taq DNA polymerase and 0.4 mM of each primer. The reaction mixture was cycled at 94°C for 1.15 min, at 50°C for 1.15 min and at 72°C for 2.15 min for as many cycles as were needed to produce a band of a product of the appropriate size. The product from this PCR (ca. 0.25  $\mu$ g) was combined with the product of the standard PCR (ca. 1.0  $\mu$ g) prior to transcription with T7 RNA polymerase.

After the eleventh cycle of selection, the product of

PCR was ligated directly into the pCRII vector (Invitrogen, USA) in accordance with the protocol provided by Invitrogen. DNA was isolated from individual clones by the alkaline lysis method and sequenced with a Dye Terminator Sequencing Kit [Applied Biosystems Inc. (ABI)] on a DNA sequencer (model 373A; ABI).

[Filter Binding Assay]

For evaluation of the binding activities of pool RNAs from different selection cycles, as well as those of individual aptamers, internally labeled RNAs were prepared using 0.5  $\mu$ Ci/ml [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTP. Conditions for binding and transcription in vitro were similar to those used for selection except that the molar ratio of RNA to Tat was 1:1 (330 nM : 330 nM). The filters were washed with 1 ml of binding buffer, air-dried, and radioactivity on filters was quantitated with the image analyzer (BAS2000). To ensure that the binding was specific, we added a ten-fold molar excess of tRNA as a nonspecific competitor to each binding reaction.

[Gel-shift competitive binding assay]

The 5'-end labeled mini 11G-31 RNA and TAR RNA were mixed initially at a molar ratio of one to one. Various ratios of TAR to mini 11G-31 RNA, ranging from 1:1 to 1:200, were prepared after adjustment of concentrations with non-labeled mini 11G-31 and TAR RNA (40 nM mini 11G-31 and increasing concentrations of TAR RNA, from 40-8,000 nM). Both RNAs were denatured at 94°C for 2 min and then allowed to equilibrate at ambient temperature. The RNA samples were then allowed to bind to 80 nM RE peptide at 30°C for 12 h, to allow quantitation of the RNA-protein complex at the equilibrium point. The reaction products were separated on a non-denaturing gel and the amounts of complexes formed

by the two RNAs were analyzed.

To characterize the individual aptamers from the eleventh selection cycle, we performed similar competitive binding assays, in which individual RNAs (10-100 nM) were allowed to compete with authentic TAR in the presence of 100 nM CQ peptide.

[Synthesis of mini 11G-31 RNA duplexes]

In order to establish the importance of double TAR-like motif of 11G-31 for efficient binding to the Tat-derived peptide (CQ), four strands of oligoribonucleotides were chemically synthesized to prepare four duplex RNAs after deleting the loop sequences from mini11G-31 RNA and their sequences are as follows: 5' RNA oligo (5'-ACGAAGCUUGAUCCCGAGAC-3' (配列番号 3)), 3' RNA oligo (5'-GUCUCGGUCGAUCGCUUCGU-3' (配列番号 1 3)), 5'  $\Delta$ UU RNA oligo (5'-ACGAAGCGAUCCCGAGAC-3' (配列番号 1 4)), 3'  $\Delta$ UC RNA oligo (5'-GUCUCGGGAUCGCUUCGU-3' (配列番号 1 5)). These oligo's functional groups were deprotected by established protocols (ABI manual) and purified on a 20% polyacrylamide gel.

[発明の効果]

本発明により、HIV-1のTatタンパク質に対して、特異的にかつ高い親和性で結合することができるRNAが提供された。このRNAは、HIV-1の転写阻害に利用することができる。



## 〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：59

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムRNA

配列：

GGGUCUCUCU GGUUAGACCA GAUUUGAGCC UGGGAGCUCU CUGGCUAACU AGGGAACCC 59

配列番号：2

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列：

ACGAAGCUUG AUCCCGUUUG CCGGUCGAUC GCUUCGA 37

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列の特徴：

存在位置：8..9

他の情報：相補鎖が存在しない

存在位置：13..14

他の情報：相補鎖は3'→5'方向にこの位置からのびる

一本鎖RNA「3'-CU-5'」を有する

配列：

ACGAAGCUUG AUCCCGAGAC

20

配列番号：4

配列の長さ：165

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列：

GGGAGAAUUC CGACCAGAAG CUUGAUCCCG UUUGCCGGUC GAUCGCUGUA UGUUUCGUUU 60

AAACGAACCU GGAUGUCCU GUCUUUGCUU UAUGCGUCGU GUUGACCCGA GACUGGGGAA 120

UUCUUUAAUU UCGUGUAGUC AUAUGUGCGU CUACAUGGAU CCUCA

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GGGTTCCTA GTTAGCCAGA

20

配列番号：6

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TTAGTCATCG CTATTACCAT GG

22

配列番号：7

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGGCCTGGAT TCACAGGACG GGTG

24

配列番号：8

配列の長さ：36

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Cys Phe Thr Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg 16

Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser 32

Leu Ser Lys Gln 36

配列番号：9

配列の長さ：38

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列：

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr	16
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp	32
Pro Thr Gly Pro Lys Glu	38

配列番号：10

配列の長さ：169

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：unsure

存在位置：24..143

## 配列：

GGGAGAAUUC CGACCAGAAG CUUNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	60
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	120
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNCAUAUGU GCGUCUACAU GGAUCCUCA	169

配列番号：11

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AGTAATACGA CTCACTATAG GGAGAATTCC GACCAGAAG	39
--	----

配列番号：12

配列の長さ：2 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

TGAGGATCCA TGTAGACGCA CATA

24

配列番号：1 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列：

GUCUCGGUCG AUCGCUUCGU

20

配列番号：1 4

配列の長さ：1 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列：

ACGAAGCGAU CCCGAGAC

18

配列番号：1 5

配列の長さ：1 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成RNA

配列：

GUCUCGGGAU CGCUUCGU

18

#### References

Aboul-ela, F., Karn, J., and Varani, G. (1995). The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J. Mol. Biol.* 253, 313-332.

Aboul-ela, F., Karn, J., and Varani, G. (1996). Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals as a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res.* 24, 3974-3982.

Arya, S.K., Guo, C., Joseph, S.F., and Wong-Staal, F. (1985). Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229, 69-73.

Berkhout, B., Silverman, R.H., and Jeang, K.T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59, 273-282.

Berkhout, B., and Jeang, K.T. (1989). Trans-activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence-specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J. Virol.* 63, 5501-5504.

Berkhout, B., and Jeang, K.T. (1991). Detailed mutational analysis of

TAR RNA: critical spacing between the bulge and loop recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 19, 6169-6176.

Bohjanen, P.R., Colvin, R.A., Puttaraju, M., Been, M.D., and Garcia-Blanco, M.A. (1996). A small circular TAR RNA decoy specifically inhibits Tat-activated HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res.* 24, 3733-3738.

Calnan, B.J., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A.D. (1991a). Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.* 5, 201-210.

Calnan, B.J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A.D. (1991b). Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 252, 1167-1171.

Chang, Y.-N., and Jeang, K.-T. (1992). The basic RNA-binding domain of HIV-2 Tat contributes to preferential trans-activation of a TAR-2-containing LTR. *Nucleic Acids Res.* 20, 5465-5472.

Churcher, M.J., Lmont, C., Hamy, F., Dingwell, C., Greem, S.M., Lowe, A.D., Butler, P.D.G., Gait, M.J., and Karn, J. (1993). High-affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus Tat protein requires amino acid residues flanking the basic domain and base pairs in the RNA stem. *J. Mol. Biol.* 230, 90-110.

Cordingly, M.G., La Femina, R.L., Callahan, P.L., Condra, J.H., Sardana, V.V., Graham, D.J., Nguyen, T.M., Le Grow, K., Gotlib, L., Schlabach, A.J., and Colonno, R.J. (1990). Sequence-specific interaction of Tat

protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8985-8989.

Cullen, B.R. (1986). Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. Cell 46, 973-982.

Cullen, B.R. (1992). Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. Microbiol. Rev. 56, 375-394.

Dang, C.V., and Lee, W.M.F. (1989). Nuclear and nucleolar targetting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. J. Biol. Chem. 264, 18019-18023.

Dayton, A.L., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C., and Haseltine, W.A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. Cell 44, 941-947.

Dingwell, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A., and Valerio, R. (1989). Human immunodeficiency virus 1 Tat protein binds trans-activation-response region (TAR) RNA in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8985-8989.

Ellington, A.D., and Szostak, J. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. Nature 355, 850-852.

Endo, S.-I., Kubota, S., Siomi, H., Adachi, A., Oroszlan, S., Maki, M., and Hatanaka, M. (1989). A region of basic amino-acid cluster in HIV-1



Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. *Virus Genes* 3, 99-110.

Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S.Z., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 344, 84-86.

Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R.A., Wingfield, P., and Gallo, R.C. (1993). Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral trans-activation. *J. Virol.* 67, 277-287.

Peng, S., and Holland, E.C. (1988). HIV-1 Tat trans-activation requires the loop sequence within TAR. *Nature* 334, 165-167.

Ferbeyre, G., Bourdeau, V., and Cedergren, R. (1997). Does HIV tat protein also regulate genes of other viruses present in HIV infection? *Trends in Biochem. Sci.* 22, 115-116.

Fisher A.G., Feinberg, M.B., Josephs, S.F., Harper, M.E., Marselle, L.M., Reyes, G., Gonda, M.A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1986). The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320, 367-371.

Frankel, A.D., Bredt, D.S., and Pabo, C.O. (1988). Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* 240, 70-73.

Garcia, J.A., Harrich, D., Pearson L., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R. (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.* 7, 3143-3147.

Garcia-Martinez, L.F., Ivanov, D., and Gaynor, B. (1997). Association of Tat with purified HIV-1 and HIV-2 transcription preinitiation complexes. *J. Biol. Chem.* 272, 6951-6958.

Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., and Jeang K.-T. (1991). Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251, 1597-1600.

Gaynor, R. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* 6, 347-363.

Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., and Yarus, M. (1985). Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 763-797.

Graham, G.J., and Maio, J.J. (1990). RNA transcription of the human immunodeficiency virus trans-activation response element can inhibit action of the viral trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5817-5821.

Harrich, D., Hsu, C., Race, E., and Gaynor, R.B. (1994). Differential growth kinetics are exhibited by human immunodeficiency virus type 1 TAR mutants. *J. Virol.* 68, 5899-5910.

Harrich, D., Ulich, C., Garcia-Martinez, L.F., and Gaynor, R.B. (1997).

Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. EMBO J. 16, 1224-1235.

Harrison, G.S., Long, C.J., Curiel, T.J., Maxwell, F., and Maxwell, H. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-1-regulated diphtheria toxin A chain gene. Hum. Gen. Ther. 3, 461-469.

Hauber, J., and Cullen, B.R. (1988). Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. J. Virol. 62, 673-679.

Jakobovits, A., Smith, D.H., Jakobovits, E.B., and Capon, D.J. (1988). A discrete element 3' of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV transactivator. Mol. Cell. Biol. 8, 2555-2561.

Jeang, K.T., Berhout, B., and Dropulic, B. (1993). Effects of integration and replication on transcription of the HIV-1 long terminal repeat. J. Biol. Chem. 268, 24940-24949.

Jones, K.A., and Peterlin, B.M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. Annu. Rev. Biochem. 63, 717-743.

Kubota, S., Endo, S.-I., Maki, M., and Hatanaka, M. (1988). Role of cysteine-rich region of HIV Tat protein in its trans-activation ability. Virus Genes 2, 113-118.

Lazinski, D., Grzadzilska, E., and Das, A. (1989). Sequence-specific

recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59, 207-218.

Leung, D.W., Chen, E., and Goeddel, D.V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segments using a modified polymerase chain reaction. *J. Methods Cell and Mol. Biol.* 1, 11-15.

Liszewicz, J., Sun D., Smythe, Lusso, P., Lori, F., Louie A., Markham, P., Rossi, J., Reitz, M., and Gallo, R.C. (1993). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by regulated expression of a polymeric Tat activation response RNA decoy as a strategy for gene therapy in AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8000-8004.

Long, K.S., and Crothers, D.M. (1995). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat-derived peptides with TAR RNA. *Biochemistry* 34, 8885-8895.

Marciniak, R.A., Calnan, B.J., Frankel, A.D., and Sharp, P.A. (1990). HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro. *Cell* 63., 791-802.

Osborne, S.E., and Ellington, A.D. (1997). Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* 97, 349-370.

Peterline, B.M., Luciw, P.A., Barr, P.J., and Walker, M.D. (1986). Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9734-9738.

Puglisi, J.D., Tan, R., Calnan B.J., Frankel, A.D., and Williamson, J.R.

(1992). Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* 257, 76-80.

Puglisi, J.D., Chen, L., Frankel, A.D., and Williamson, J.R. (1993). The role of RNA structure in arginine recognition of TAR RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3680-3684.

Rice, A.P., and Mathews, M.B. (1988). Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the Tat gene product. *Nature* 332, 551-553.

Rosen, C.A., Sodroski J.G., and Haseltine W.A. (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in human T cell lymphotropic virus type III. *Cell* 41, 813-823.

Rounseville, M.P., and Kumar, A. (1992). Binding of a host cell nuclear protein to the stem region of human immunodeficiency virus type 1 trans-activation-response RNA. *J. Virol.* 66, 1688-1694.

Rounseville, M.P., Lin, H.-C., Agbottah E., Shukla, R.R., Rabson, A.B., and Kumar, A. (1996). Inhibition of HIV-1 replication in viral mutants with altered TAR RNA stem structures. *Virol.* 216, 411-417.

Roy, S., Delling, U., Chen, C. H., Rosen, C.A., and Sonenberg, N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4, 1365-1373.

Sheline, C.T., Milocco, L.H., and Jones, K.A. (1991). Two distinct nuclear transcription factors recognize loop and bulge residues of the

HIV-1 TAR RNA hairpin. *Genes Dev.* 5, 2508-2520.

Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F., and Haseltine, W. A. (1985). Location of the trans-acting region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229, 74-77.

Sullenger, B. A., Gallardo, H. F., Ungers, G. E., and Gilboa, E. (1990). Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 63, 601-608.

Tan, R., and Frankel, A. D. (1992). Circular dichroism studies suggest that TAR RNA changes conformation upon specific binding of arginine or guanidine. *Biochemistry* 31, 10288-10294.

Tao, J., Chen, L., and Frankel, A. D. (1997). Dissection of the proposed base triple in human immunodeficiency virus TAR RNA indicates the importance of the Hoogsteen interaction. *Biochemistry* 36, 3491-3495.

Tuerk, C., and MacDougall-Waugh, S. (1993). In vitro evolution of functional nucleic acids: high-affinity RNA ligands of HIV-1 proteins. *Gene* 137, 33-39.

Urvil, P. T., Kakiuchi, N., Zhou, D.-M., Shimotohno, K., Kumar, P. K. R., and Nishikawa, S. (1997). Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur. J. Biochem.* 248, 130-138.

Vaishav, Y. N., and Wong-Staal, F. (1991). The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 577-630.

Verhoef, K., Tijms., and Berkhout, B. (1997). Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res.* 19, 6169-6176.

Weeks, K.M., Ampe, C., Schults, S.C., Steltz, T.A., and Crothers, D.M. (1990). Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind to TAR RNA. *Science* 249, 1281-1285.

Weeks, K.M., and Crothers, D.M. (1991). RNA recognition by Tat-derived peptides: interaction in the major groove?. *Cell* 66, 577-588.

Wu-Baer, F., Lane, W.S., and Gaynor R.B. (1995a). The cellular factor TRP-185 regulates RNA polymerase II binding to HIV-1 TAR RNA. *EMBO J.* 14, 5995-6009.

Wu-Baer, F., Lane, W.S., and Gaynor, R.B. (1996). Identification of a group of cellular factors that stimulates the binding of RNA polymerase II and TRP-185 to human immunodeficiency virus 1 TAR RNA. *J. Biol. Chem.* 271, 4201-4208.

Yamada, O., Kraus, G., Luznik, L., Yu, M., and Wong-Staal, F. (1996). A chimeric human immunodeficiency virus type 1 minimal rev responsive element-ribozyme molecule exhibits dual antiviral function and inhibits cell-cell transmission of HIV-1. *J. Virol.* 70, 1596-1601.

Yamamoto, R., Koseki, S., Ohkawa, J., Murakami, K., Nishikawa, S., Taira, K., and Kumar, P.K.R (1997). Inhibition of transcription by the TAR RNA of HIV-1 in a nuclear extract of HeLa cells. *Nucleic Acids Res.*

25, 3445-3450.

Yu, M., Poeschla, E., and Wong-Staal, F. (1994). Progress towards gene therapy for HIV infection. *Gene Ther.* 1, 13-26.

Yuyama, N., Ohkawa, J., Koguma, T., Shirai, M., and Taira, K. (1994). A multifunctional expression vector for an anti-HIV-1 ribozyme that produces a 5'- and 3'- trimmed trans-acting ribozyme, targeted against HIV-1 RNA, and cis-acting ribozymes that are designed to bind to and thereby sequester trans-activator proteins such as Tat and Rev. *Nucleic Acids Res.* 22, 5060-5067.

Zhou, Q., and Sharp, P.A. (1996). Tat-SF-1: Cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat. *Science* 274, 605-610.

Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48-52.

#### 4. Brief Explanation of the Drawings

Figure 1. Scheme for genetic selection in vitro.

Figure 2. Representative sequences and secondary structures from each class of RNAs.

Figure 3. A. Formation of complex between Tat-derived peptides (CQ and RE) and TAR RNA or mini 11G-31 RNA. Binding reactions contained 5'-end labeled RNA (15,000 cpm) and 5, 10, 20, 40, 60, 80, or 100 nM Tat-derived peptide. Complexes were separated from unbound RNAs by electrophoresis on 20% non-denaturing polyacrylamide gels. (A-1) TAR



RNA and CQ peptide; (A-2) TAR RNA and RE peptide; (A-3) mini 11G-31 RNA and CQ peptide; (A-4) mini 11G-31 RNA and RE peptide. B, Formation of complex between a bulge deletion variant, an RNA lacking the bulge residues in mini 11G-31 RNA, and Tat-derived peptides (CQ and RE). (B-1)

The RNA lacking the bulge residues in mini 11G-31 RNA and the CQ peptide; (B-2) the RNA lacking the bulge residues in mini 11G-31 RNA and the RE peptide.

Figure 4. The result of competitive binding assay. Formation of a complex when a mixture of 5'-end labeled mini 11G-31 RNA (20,000 cpm), unlabeled mini 11G-31 RNA (40 nM), and unlabeled authentic TAR RNA at various concentrations (40 to 8,000 nM) was allowed to bind with the RE peptide (80 nM) at 30 °C for 12 h. The mixture was fractionated on a non-denaturing gel as mentioned the legend to Figure 3.

Figure 5. Synthetic mini 11G-31 RNA duplexes. Bases deleted from duplex mini 11G-31 RNAs are indicated by boxes.

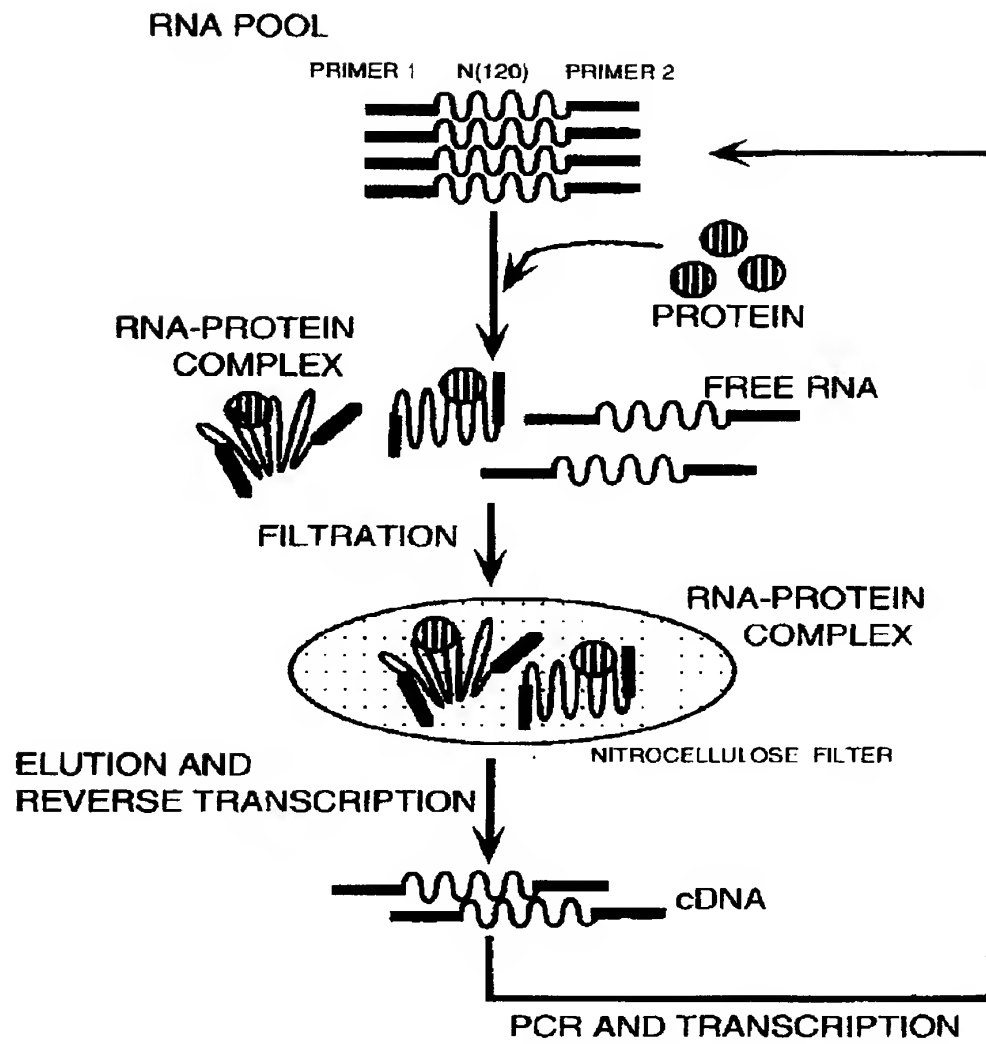
Figure 6. Formation of complex between the Tat-derived peptide CQ and duplex RNA I (mini 11G-31), duplex RNA II, duplex RNA III, or duplex RNA IV. Reaction mixtures contained either a duplex strand or RNA (one labeled RNA, usually the 5'-end-labeled oligomer and unlabeled second strand) alone or in the presence of 40 nM CQ peptide. Complexes were separated from unbound RNAs by electrophoresis on a 20% non-denaturing polyacrylamide gel. 3'  $\Delta$ UC RNA oligo alone (lane 1) or in the presence of CQ peptide (40 nM) (lane 2); duplex RNA IV either alone (lane 3) or in the presence of CQ (lane 4); 3' RNA oligo either alone (lane 5) or in the presence of CQ (lane 6); duplex RNA III either alone (lane 7) or in the presence of CQ (lane 8); duplex RNA II either alone (lane 9) or in

the presence of CQ (lane 10); duplex RNA [either alone (lane 11) or in the presence of CQ (lane 12)]. Large and small arrow heads indicate duplex RNA and CQ peptide complex and duplex RNAs, respectively.

Figure 7. Inhibition of transcription from a CMV early promoter-driven template by mini 11G-31 and authentic TAR RNA in an extract of HeLa nuclei. The template containing the early promoter of CMV was transcribed in the absence (lane 1) and in the presence (lanes 3 and 4) of 100 pmole of TAR RNA, in the presence of 100 pmole of tRNA (total tRNA from yeast; lane 2), or in the presence of 100 pmole of mini 11G-31. Single-stranded DNA markers were loaded in lane M. The newly synthesized transcript is indicated by an arrow.

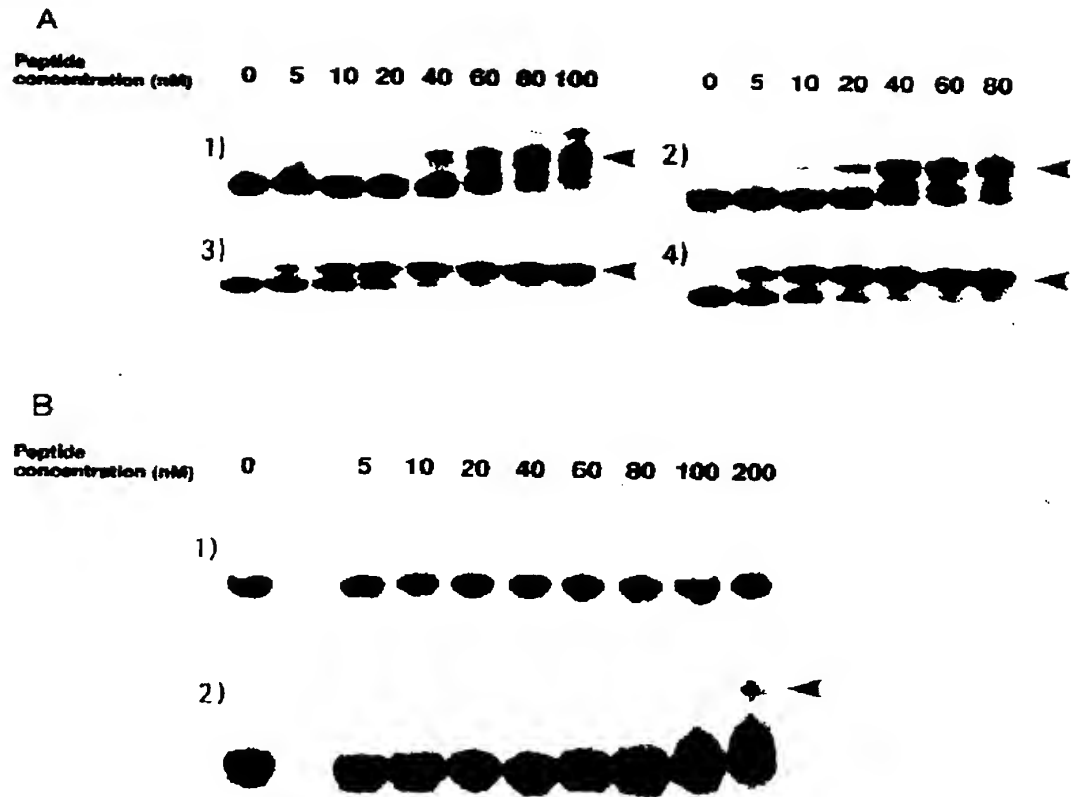
Figure 8. The relative level of transcript (364 nt) synthesized in vitro was quantitated in three independent experiments (experimental variations are indicated by error bars).

【図 1】

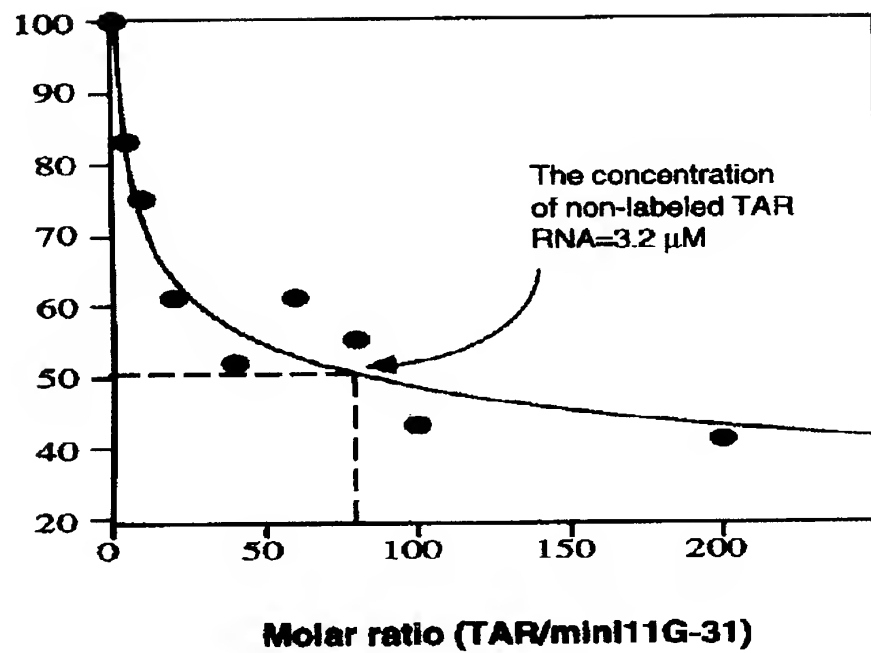




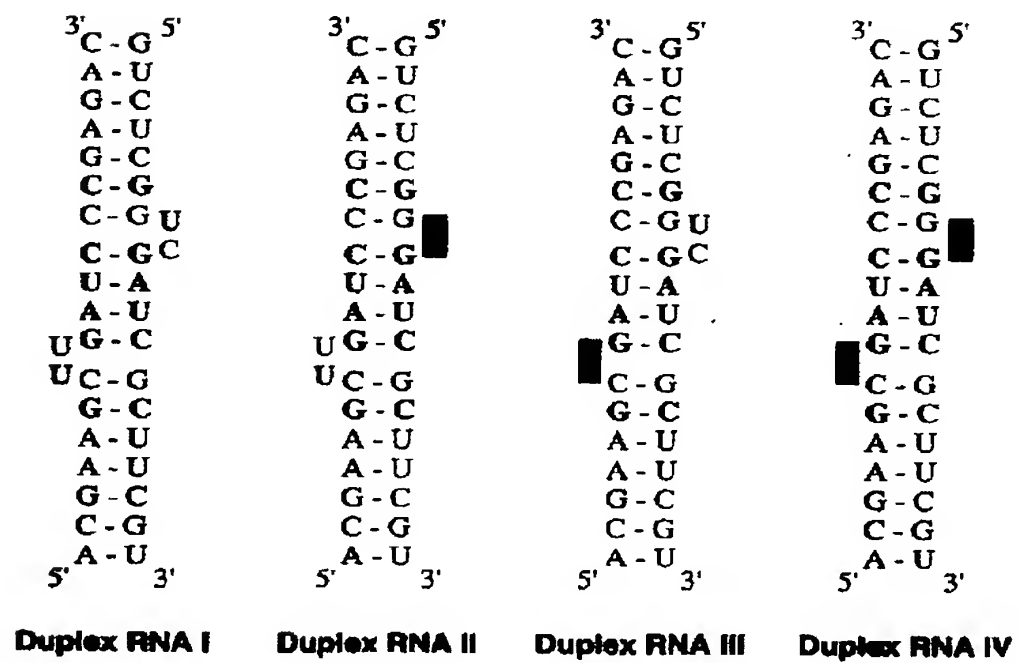
## 【図 3】



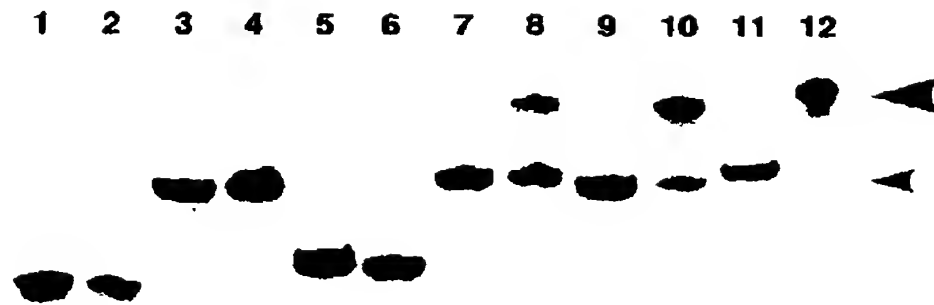
【図4】



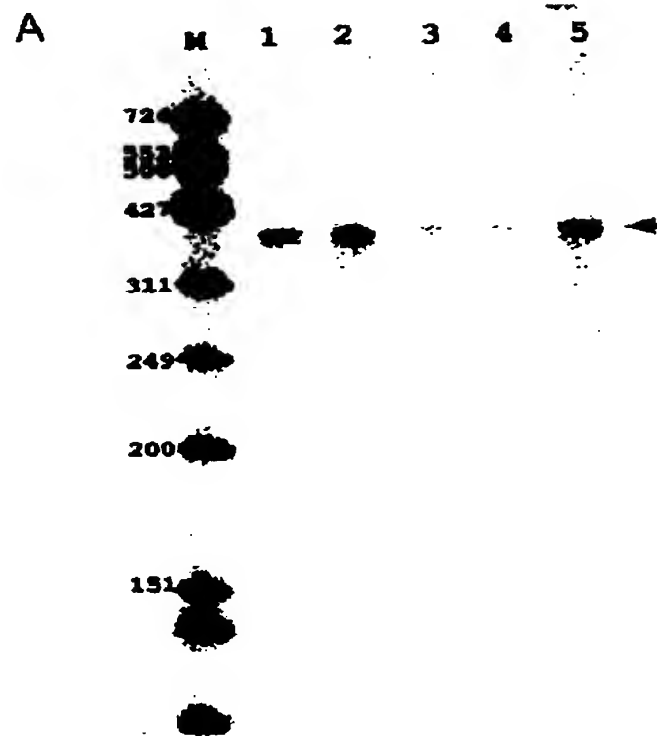
【図5】



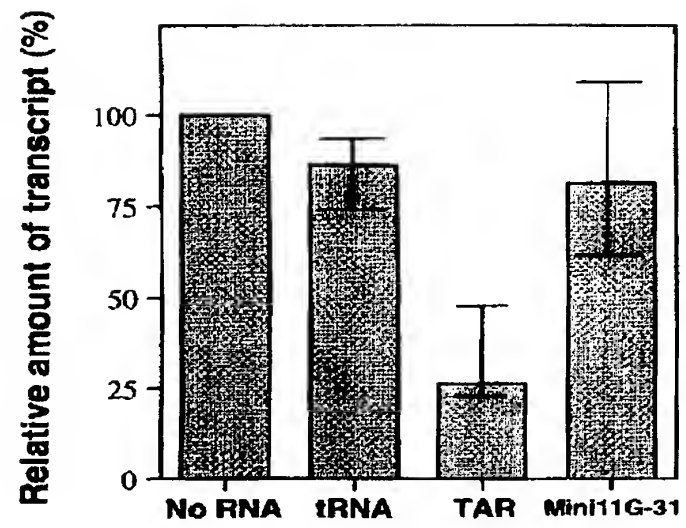
【図6】



【図7】



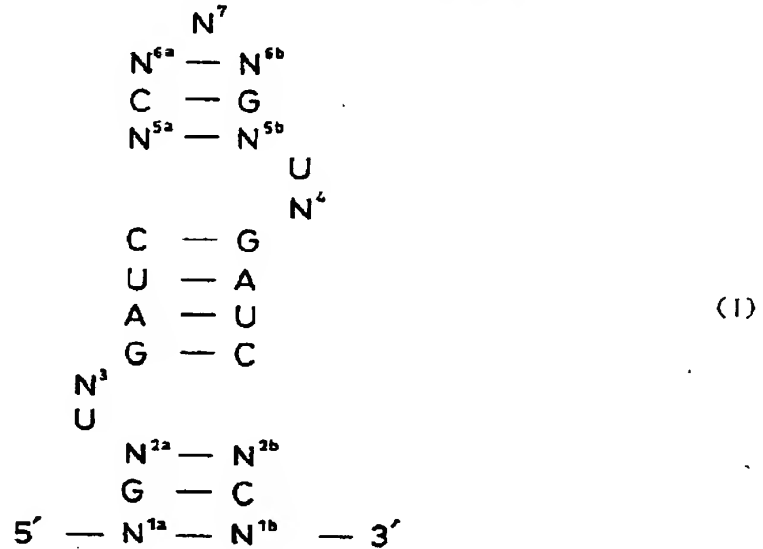
[ 図 8 ]





## 1. Abstract

A ribonucleic acid that is capable of binding to a trans-activation protein of human immunodeficiency virus and which comprises the nucleotide sequence represented by the following second structure (I):



wherein  $N^{1a}$  and  $N^{1b}$  are at least 2 pairs of nucleic acid bases,  $N^{2a}$  and  $N^{2b}$  are at least 1 pair of nucleic acid bases,  $N^3$  and  $N^4$  are each independently 1 or 2 nucleic acid base(s),  $N^{5a}$  and  $N^{5b}$  are at least 1 pair of nucleic acid bases,  $N^{6a}$  and  $N^{6b}$  are at least 1 pair of nucleic acid bases,  $N^7$  is 0-5 nucleic acid base(s), and the bold lines represent hydrogen bonds between the nucleic acid bases. Use of the ribonucleic acid.

## 2. Representative Drawing

None